

Für die Vollständigkeit und Richtigkeit der einzelnen Inhalte der „Entwicklungsbiologie für BScBiol/BScMLS/BA“ kann keine Gewähr übernommen werden. Es ist nicht gestattet, diese Vorlesung oder Teile derselben ohne ausdrückliche Genehmigung der Dozentinnen und Dozenten für die Wiedergabe im Druck, Vorträge oder eine andere Art der Veröffentlichung, auch nicht im Internet, zu verwenden. Für Teile der Abbildungen liegen die Rechte bei Buchverlagen, wissenschaftlichen Zeitschriften oder bei den Dozentinnen und Dozenten dieser Veranstaltung.

Arp Schnittger



Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Universität Hamburg
Bachelorstudiengang Biologie

Entwicklungsbiologie *Sommersemester 2021*

Arp Schnittger
Biozentrum Klein Flottbek

arp.schnittger@uni-hamburg.de

Arp Schnittger

<https://www.biologie.uni-hamburg.de/en/forschung/molekular-und-zellbiologie/entwbio.html>

12.04. -
Grundlagen

19.04. – Gametogenese,
Befruchtung und
Embryoentwicklung

26.04. – Entwicklung des
Sprosses und der Wurzel

03.05. – Blattentwicklung

17.05. – Zelltod und Seneszenz

10.05. – Blütenentwicklung

Konzepte der Vorlesung Blütenentwicklung

Das Blüten-ABC Model

**Erweiterungen des ABC Models:
Superman & "D"**

Das "E" Modul

Kontrolle des Blühzeitpunktes



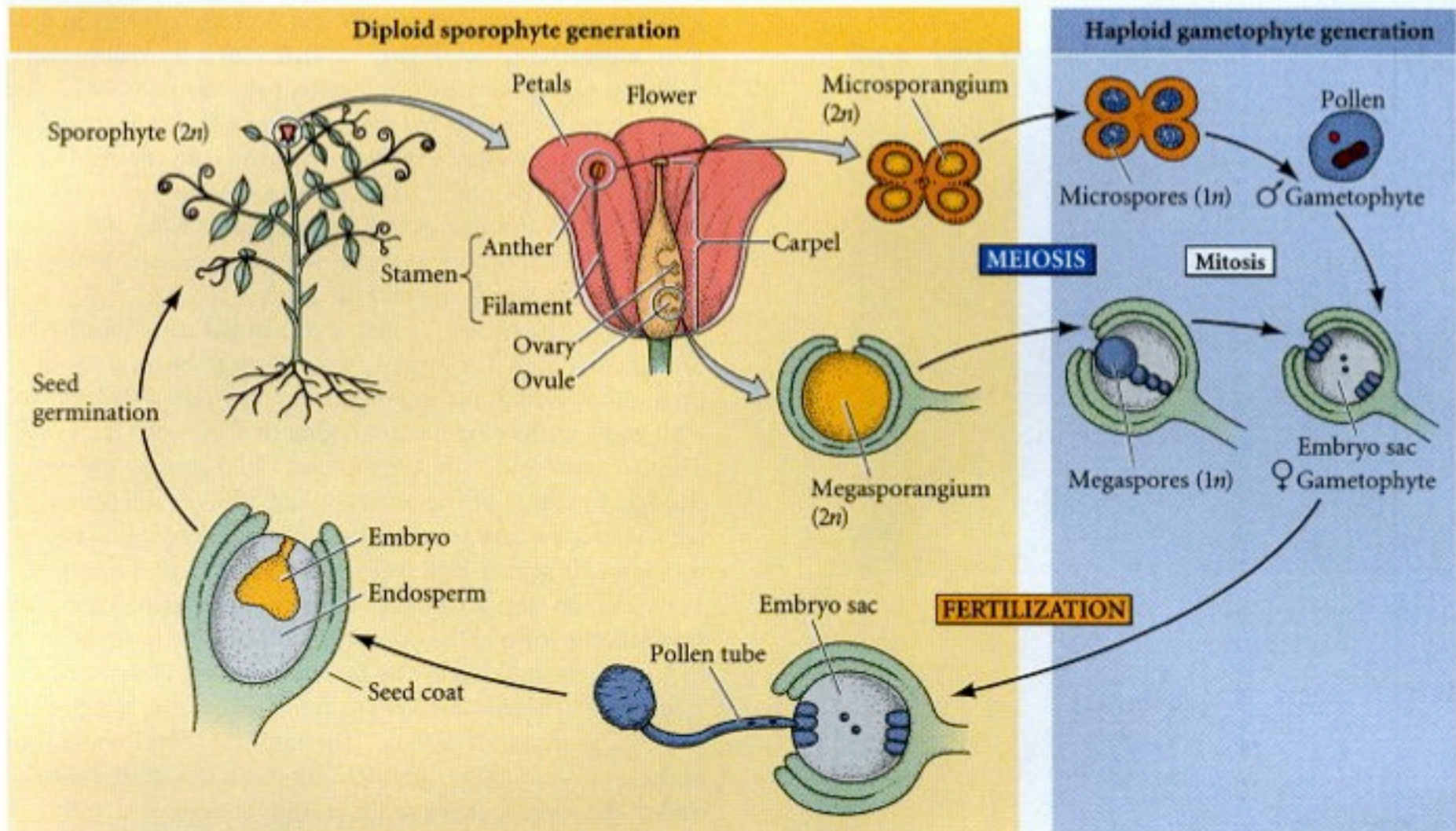
Notwendig oder hinreichend?

Hefe-2-Hybrid-System

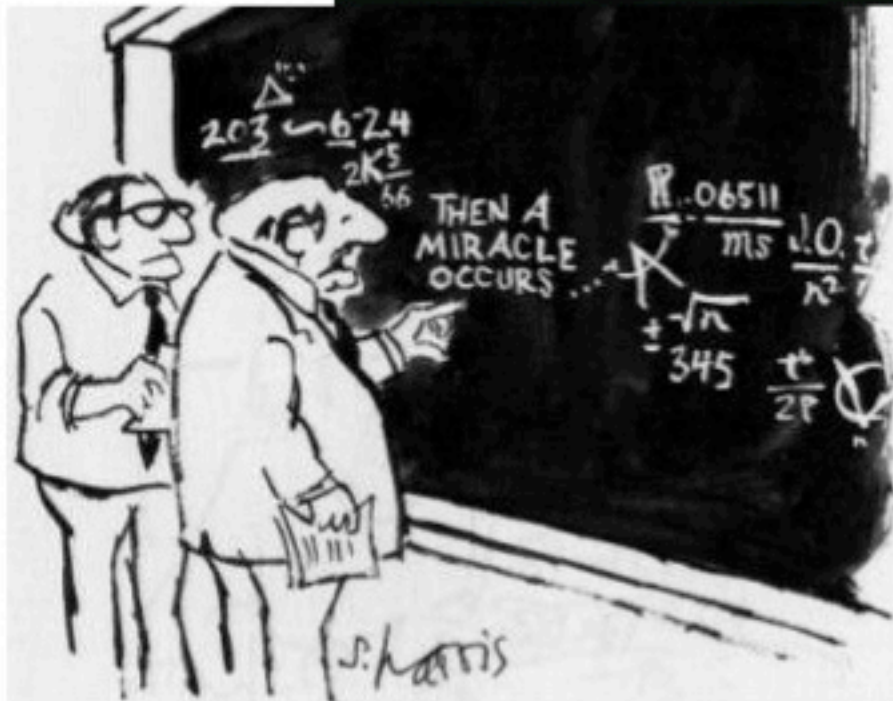
**Chromatin-Immuno-Präzipitation)
ChIP)**

Lebenszyklus der Blütenpflanzen (Angiosperme)

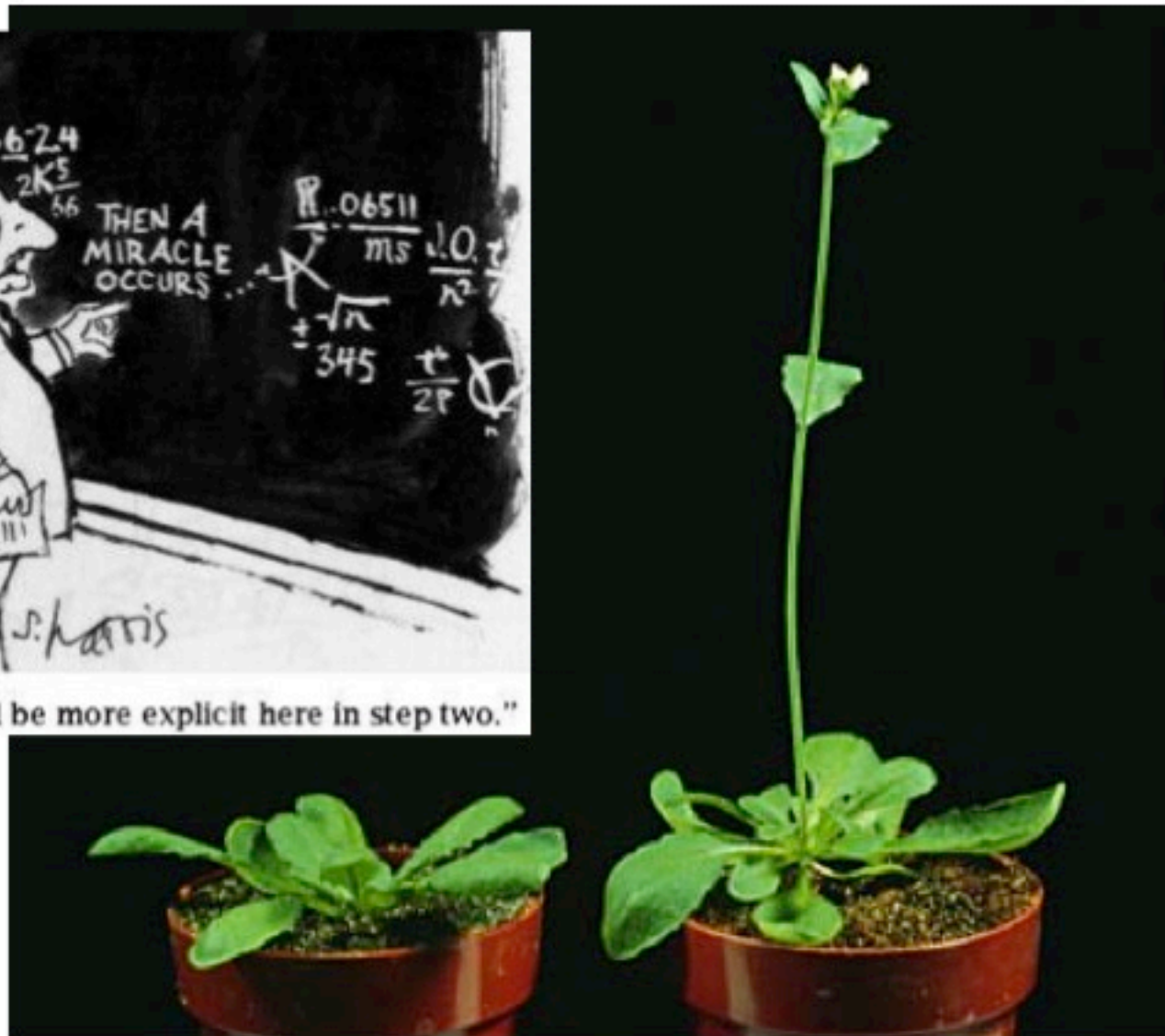
haploide und diploide Zellen im Lebenszyklus von Organismen



Untersuchung der Blütenbildung



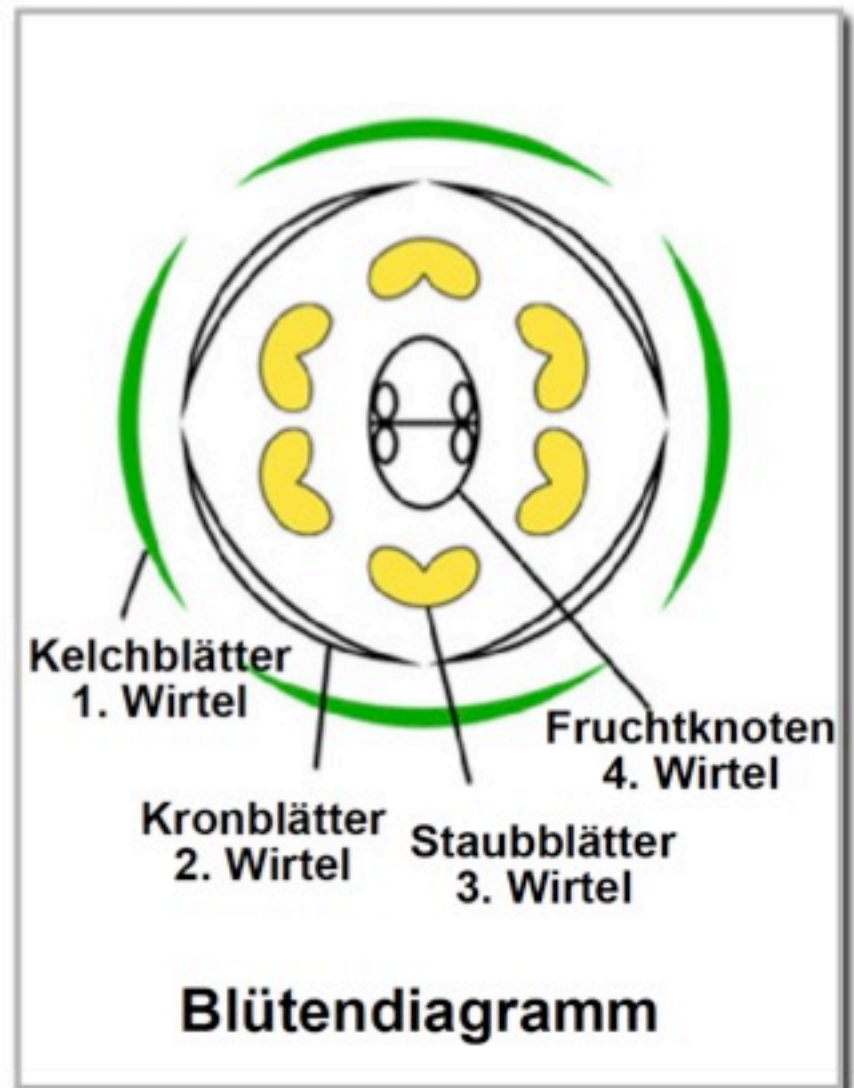
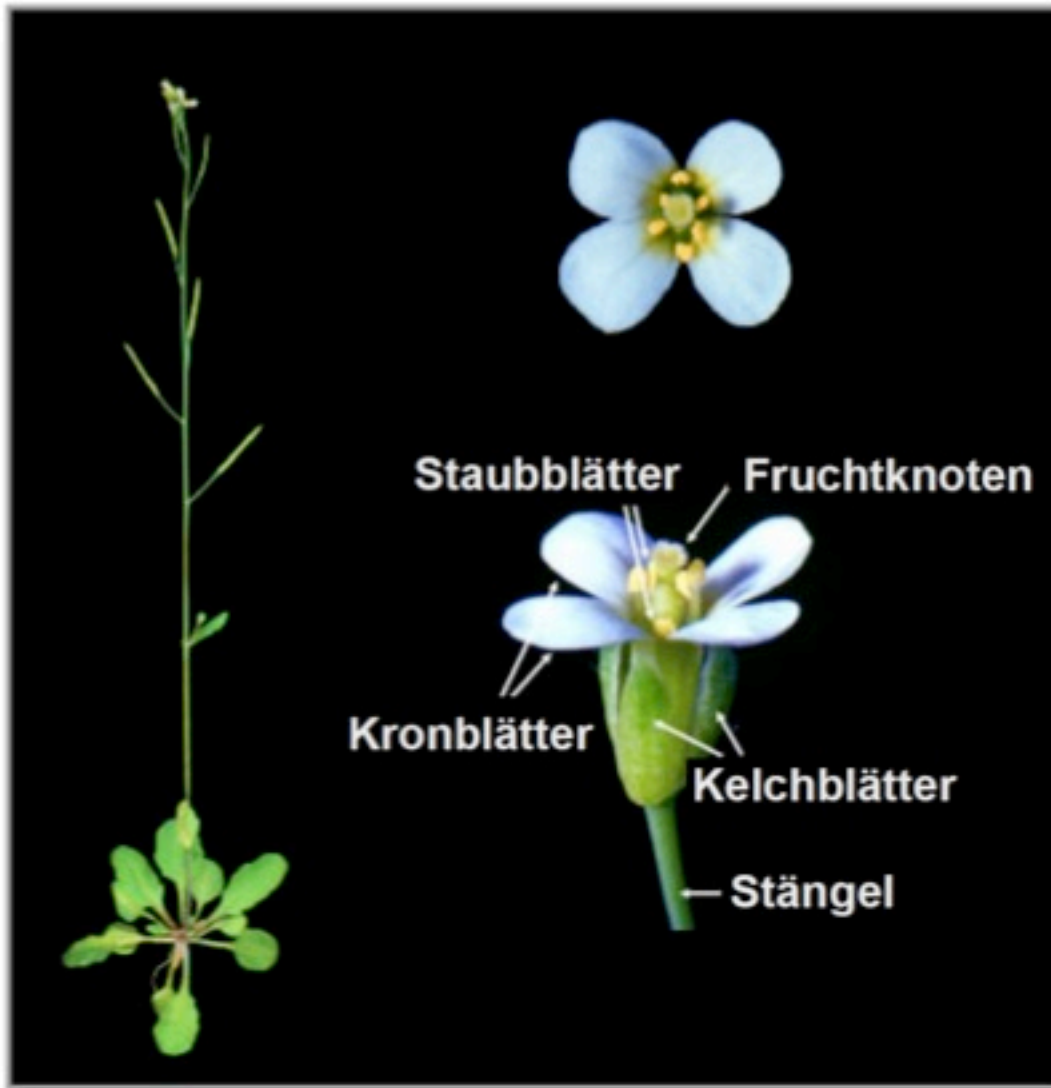
"I think you should be more explicit here in step two."



vegetative Phase

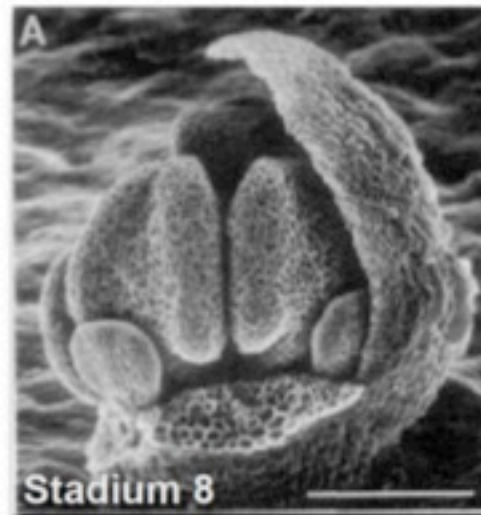
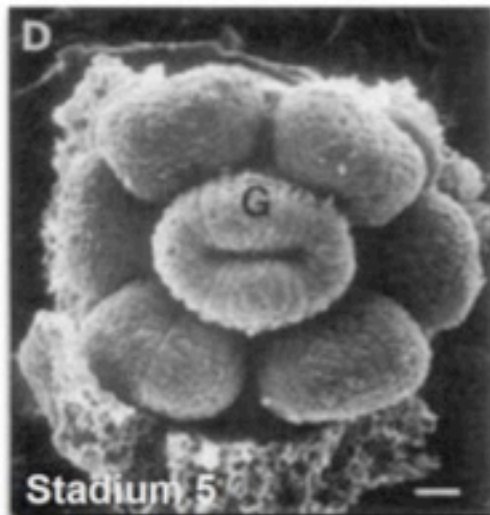
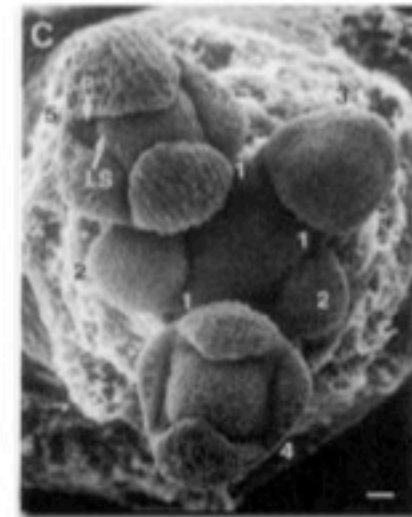
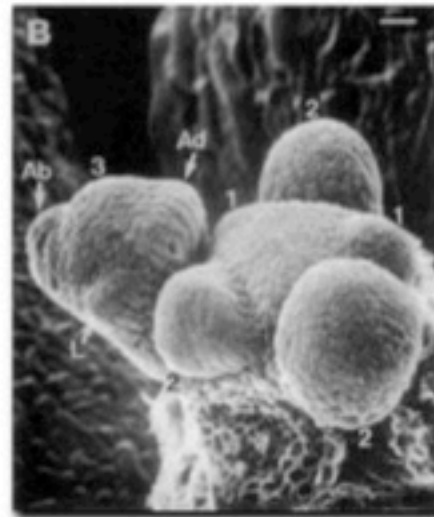
Infloreszenz und Blüte

Die Blüte von *Arabidopsis thaliana*



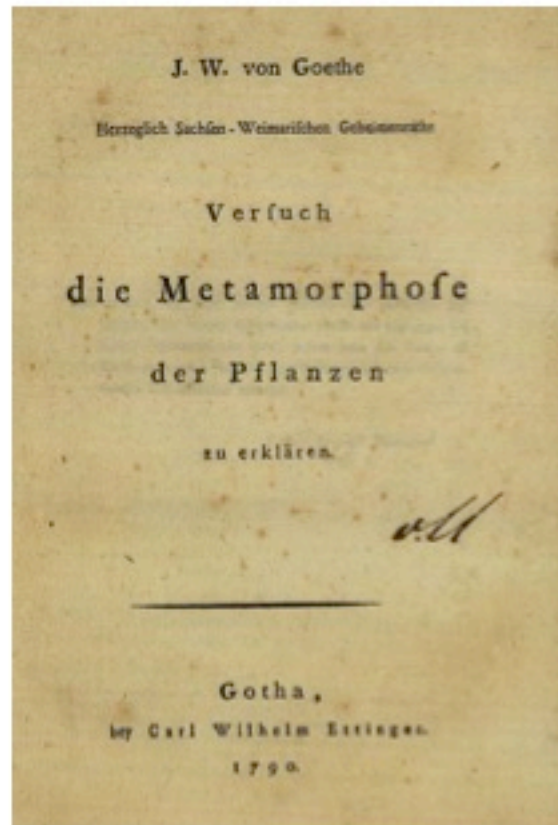
Vier Organtypen angeordnet in vier konzentrischen Ringen (Wirteln)

Blütenentwicklungsstadien



➔ Schrittweise Anlage und Elaboration der Blütenorgane

Vor über 200 Jahren...

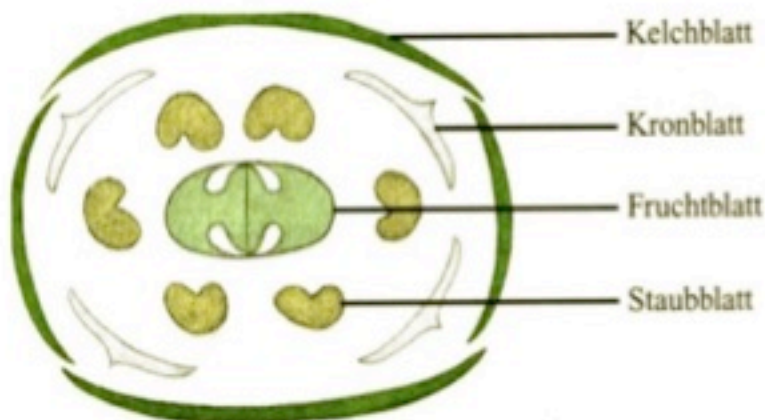


...postulierte Johann Wolfgang Goethe das die verschiedenen Teile der Pflanzen durch eine 'Metamorphose' eines generellen Organs, dem 'idealen Blatt' gebildet werden.

Sind Blüten umgewandelte Blätter?

Isolierung von verschiedenen Blütenorganmutanten

Wildtyp



Arabidopsis thaliana: 4 Wirtel



Blühzeitpunkt-Gene

z.B. *CONSTANS* (*CON*) → Zeitpunkt

z.B. *TERMINAL FLOWER* (*TFL1*)
→ Erhalt/Determinierung der
Infloreszenz

Blütenmeristem-Identitätsgene

z.B. *LEAFY* (*LFY*)

Blütenorgan-Identitätsgene



Etablierung/Erhalt des
Infloreszenzmeristems

Mutationen

→ **verfrühte/verspätete**
Blüte



Induktion
Blütenmeristems

Funktionsverlust
→ **keine Blüte**



Steuerung der
Blütenmorphologie

Funktionsverlust

→ **Fehlbildungen** der Blüte

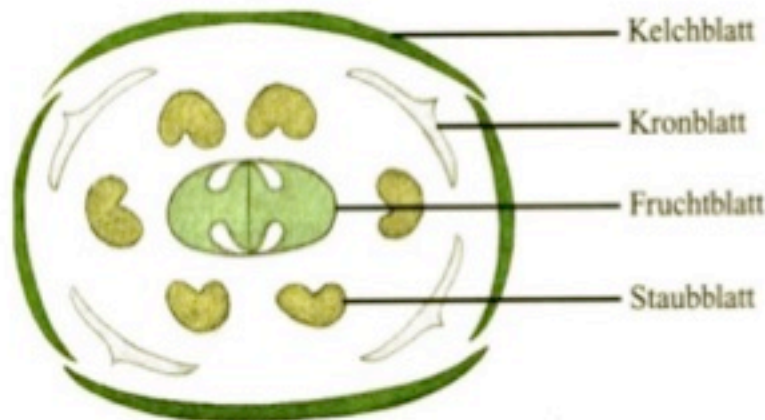
Isolierung von verschiedenen Blütenorganmutanten

Wildtyp



mutante Phänotypen:

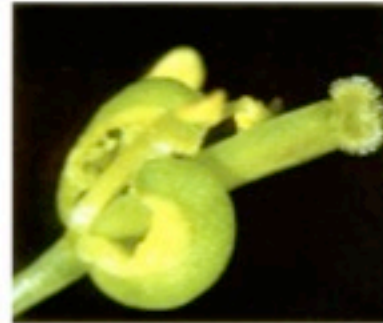
- Organe fehlen
- Organe kommen hinzu
- Organe sind misspezifiziert
- ...



Arabidopsis thaliana: 4 Wirtel

mutante Phänotypen:

- Organe fehlen
- Organe kommen hinzu
- Organe sind misspezifiziert
- **Organe sind vertauscht**
(homeotische Transformation)



apetala (ap1/ap2)

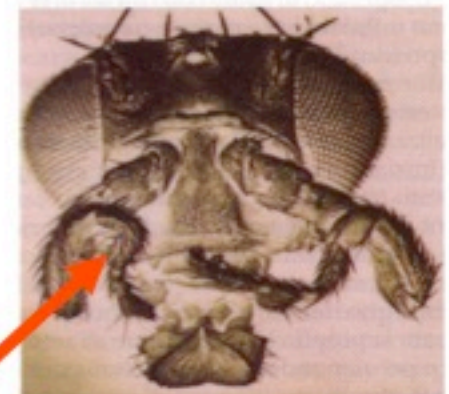
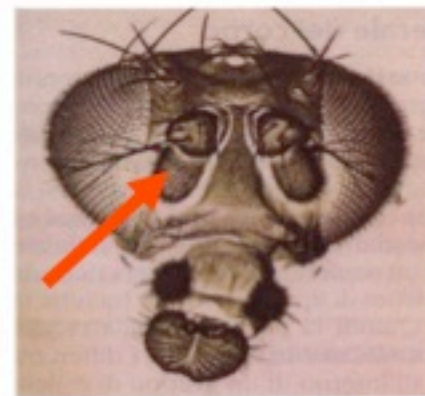


agamous (ag)



pistillata (ap3/pi)

Homeotische Gene sind Gene, die auf die **Musterbildung** während der Entwicklung vielzelliger Organismen einwirken. Sie legen den **Gesamtbauplan** dieser Organismen fest indem sie das **Entwicklungsschicksal von Zellgruppen** kontrollieren.

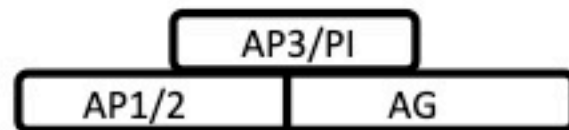


Antennapedia

pistillata/apetala 3

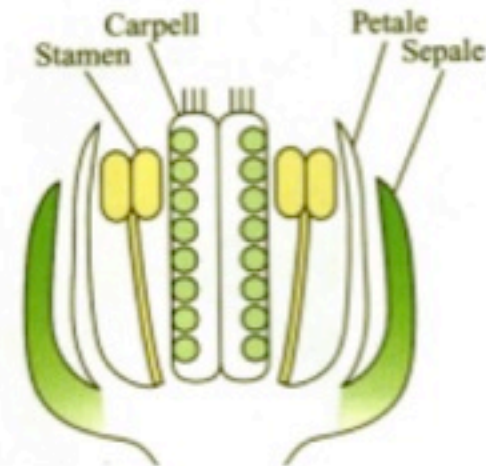
Wildtyp

Felder:



Wirtel:

Se Pe St Ca

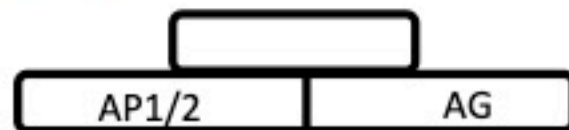


WT



pistillata/apetala 3

Felder:



Wirtel:

Se **Se** **Ca** Ca

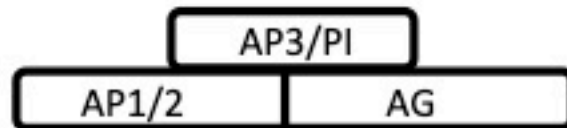


pistillata (pi)



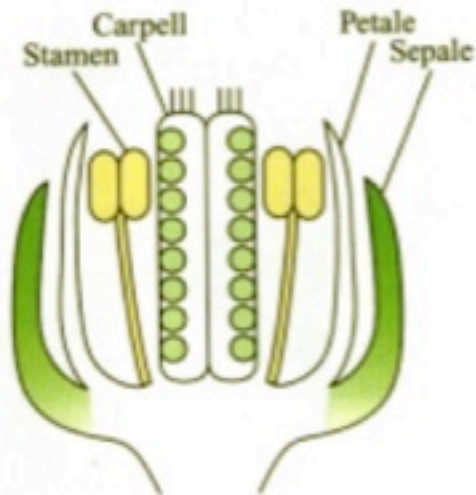
Wildtyp

Felder:

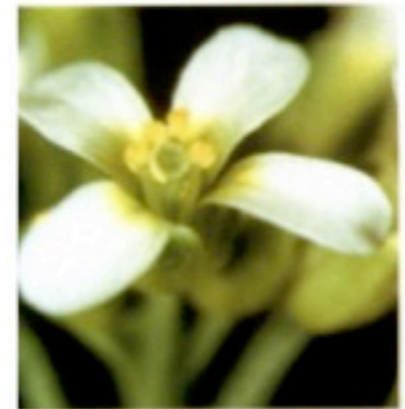


Wirtel:

Se Pe St Ca

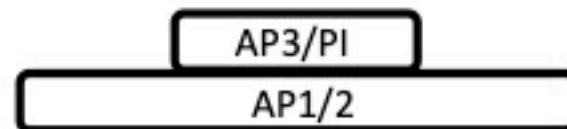


WT



agamous

Felder:



Wirtel:

Se Pe **Pe** **Se**



agamous (ag)



‘Doppelblumen’



Arabidopsis
agamous Mutante



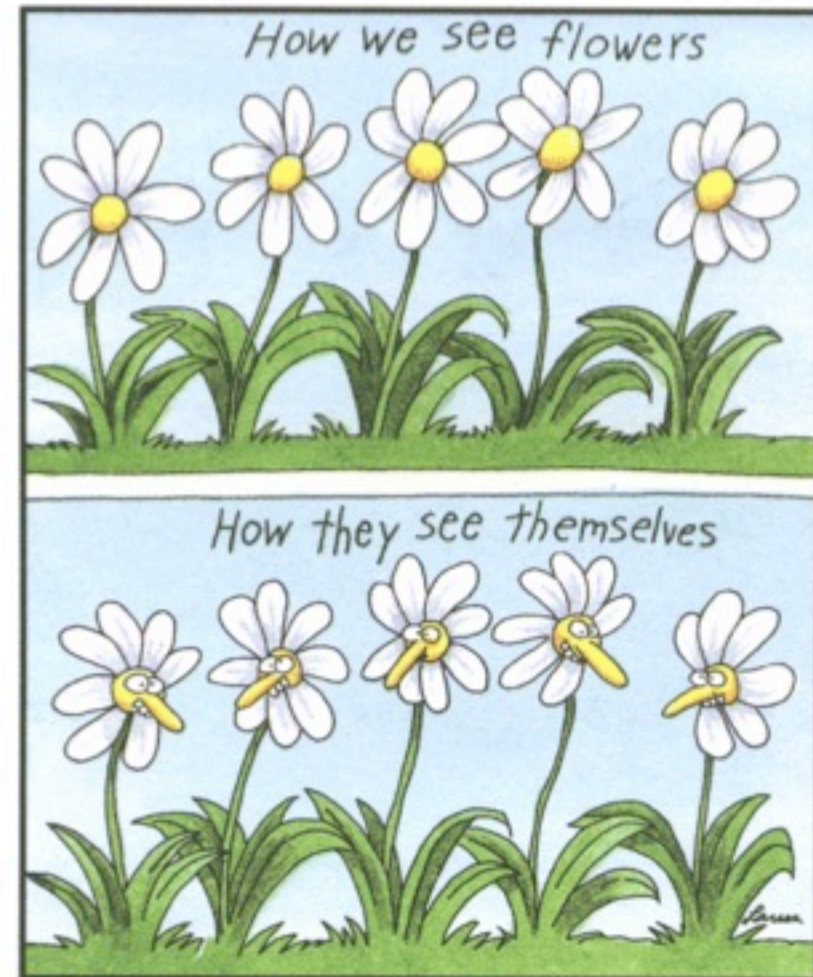
Japanische Kamelie
(Camelia japonica)



Rose



Pfingstrose



‘Doppelblumen’



Arabidopsis
agamous Mutante



Japanische Kamelie
(Camelia japonica)



Rose



Pfingstrose

Weltmarkt für Schnittblumen
im Jahre 2000: **7 Milliarden US-Dollar**
(Wikipedia).

Der größte Exporteur von
Schnittblumen: **Niederlande.**

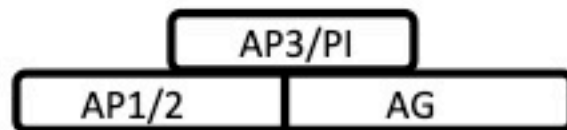
Weltweit größter Importeur von
Schnittblumen: **Deutschland.**



apetala 1/apetala 2

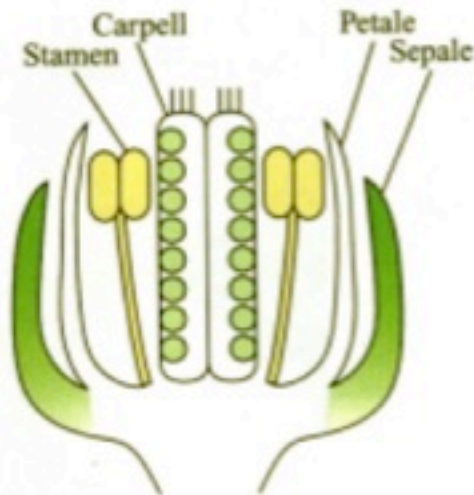
Wildtyp

Felder:

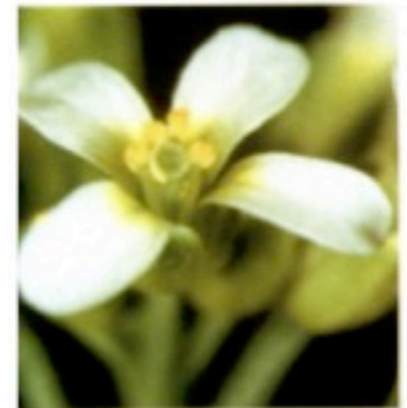


Wirtel:

Se Pe St Ca

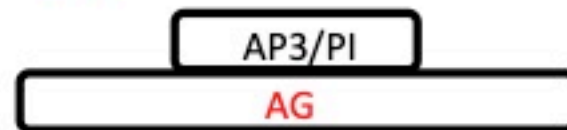


WT



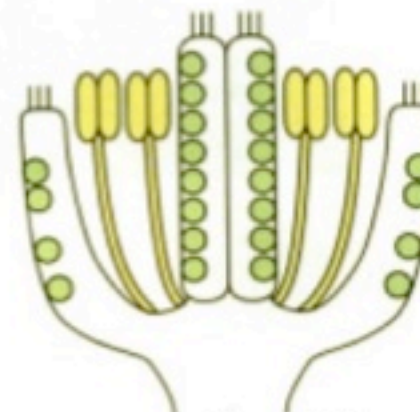
apetala 1/apetala 2

Felder:



Wirtel:

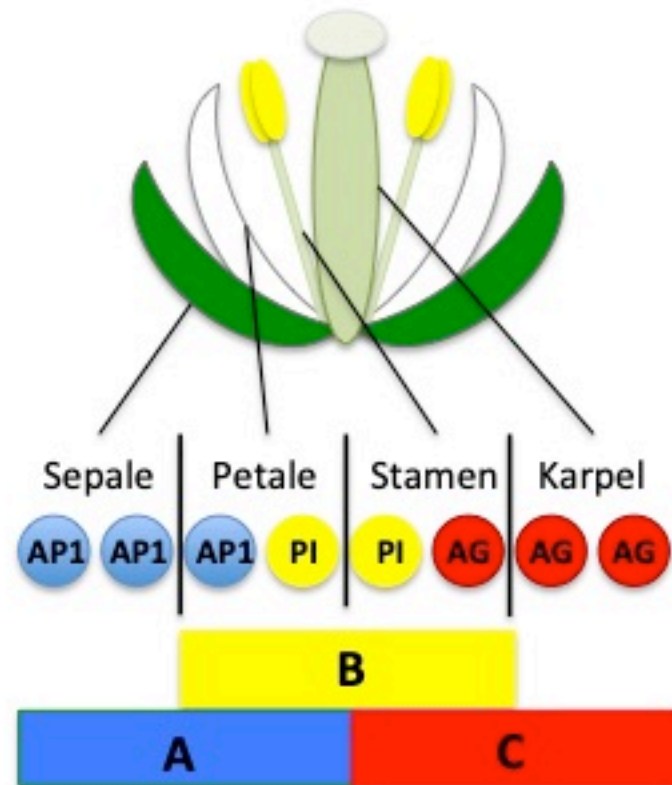
Ca St St Ca



apetala 1/apetala 2 (ap1/ap2)



Das ,klassische‘ A-B-C Modell



WT



apetala (ap1/ap2)



agamous (ag)



pistillata (ap3/pi)



Konzepte der Vorlesung Blütenentwicklung

Das Blüten-ABC Model

**Erweiterungen des ABC Models:
Superman & "D"**

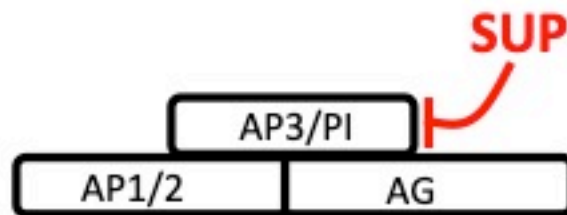


superman (SUP)

Katastergene kontrollieren die Grenzen zwischen Wirteln

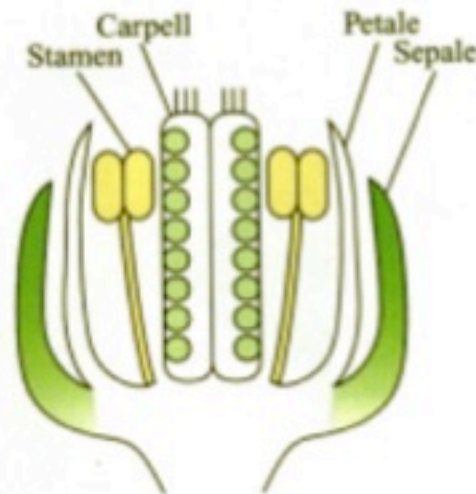
Wildtyp

Felder:

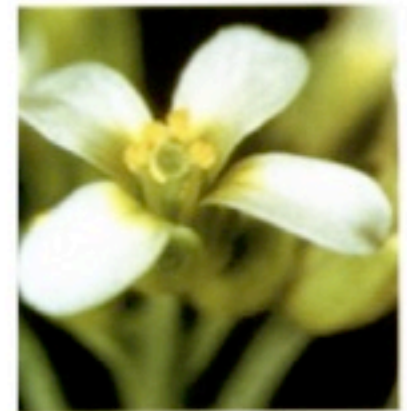


Wirtel:

Se Pe St Ca

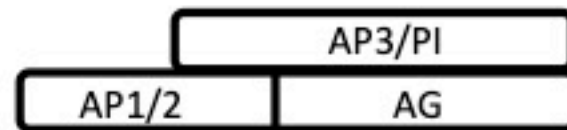


WT



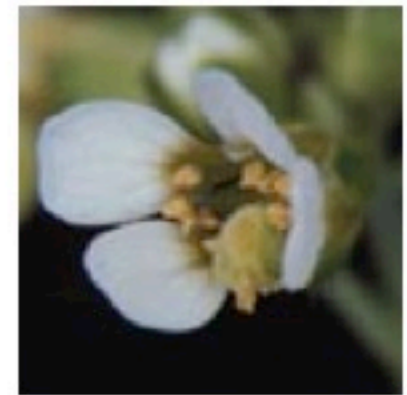
superman (sup)

Felder:



Wirtel:

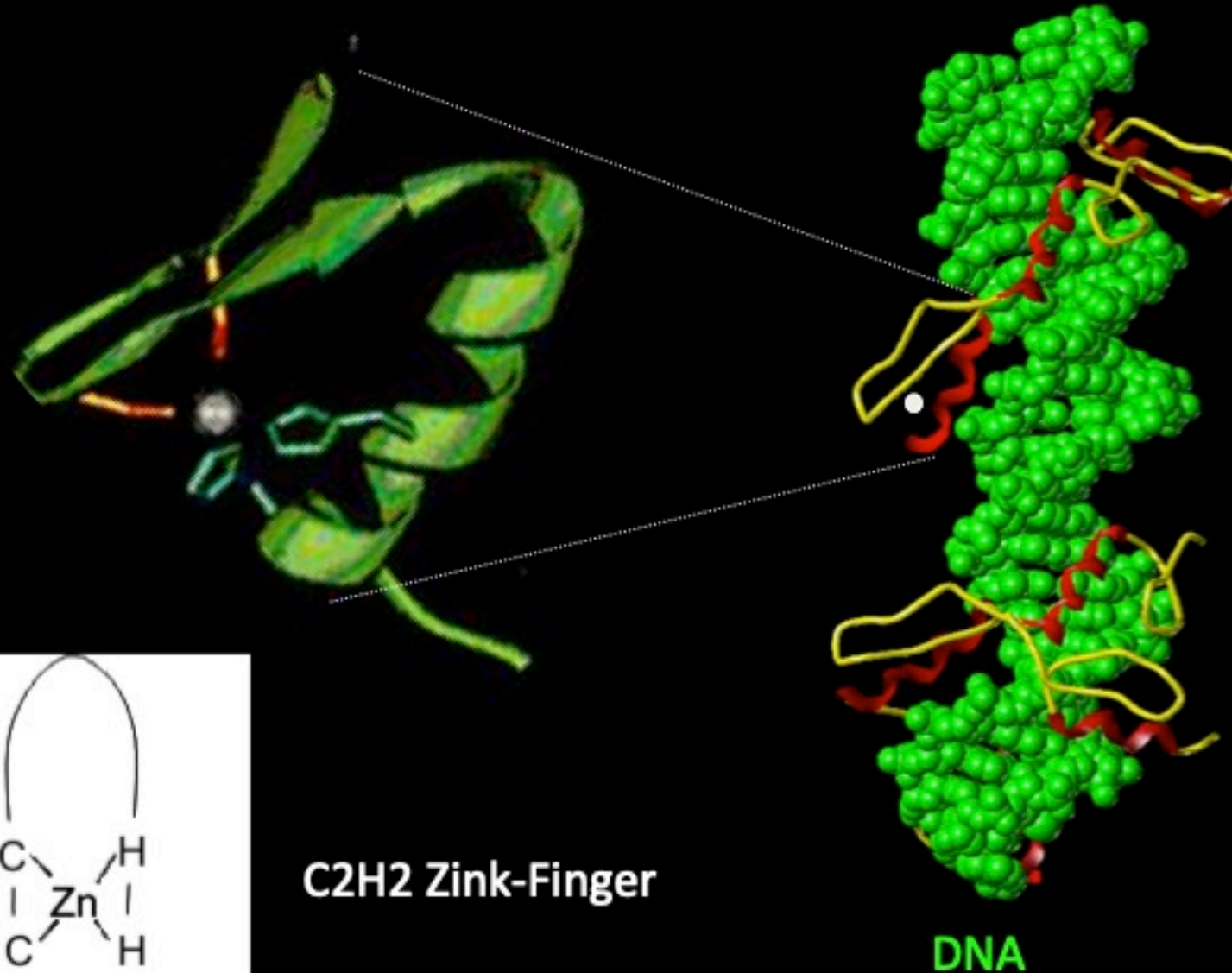
Se Pe St **St**



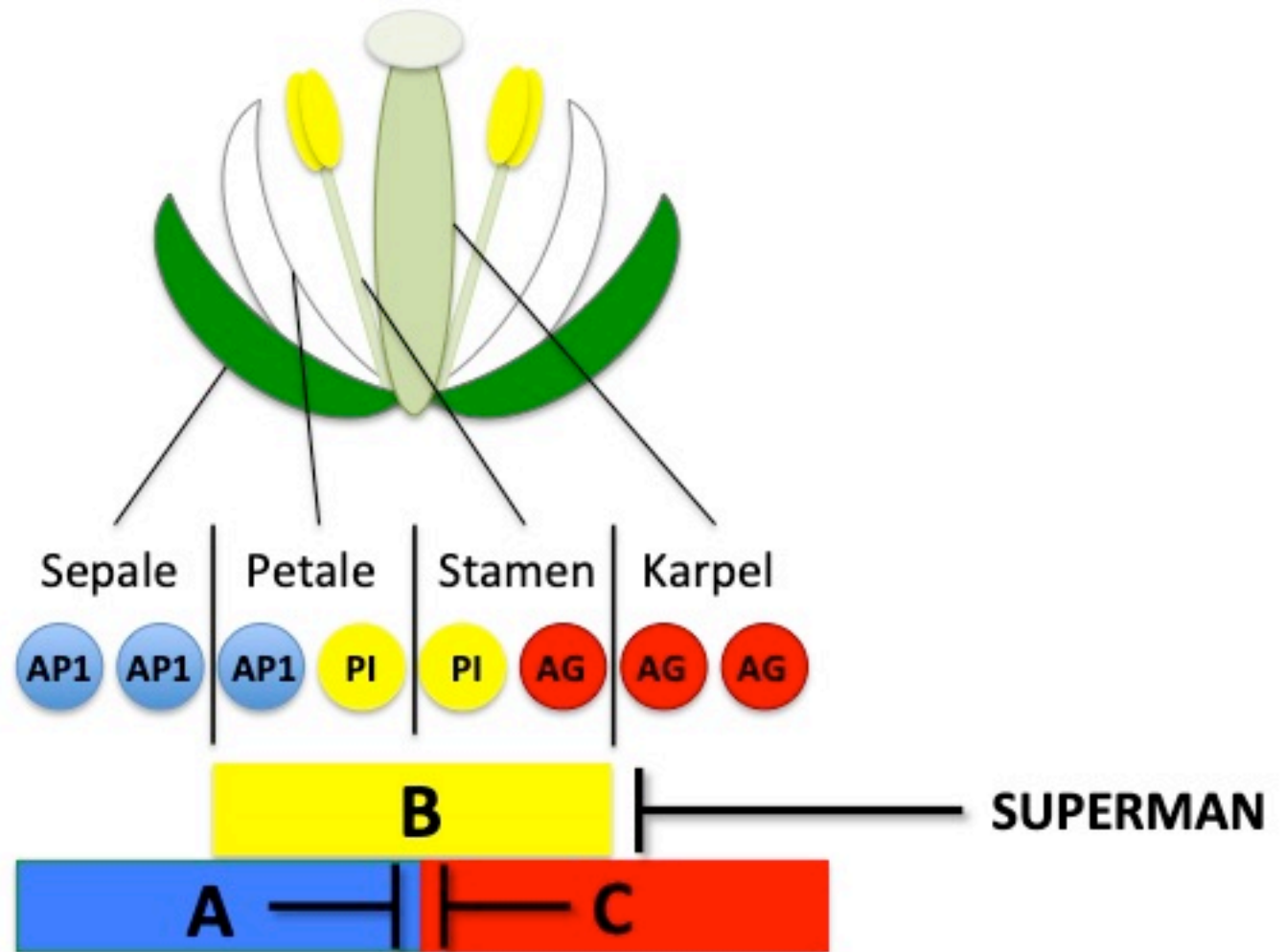
superman (sup)



SUPERMAN kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit Zink-Finger Motiv



A-B-C Modell + SUP

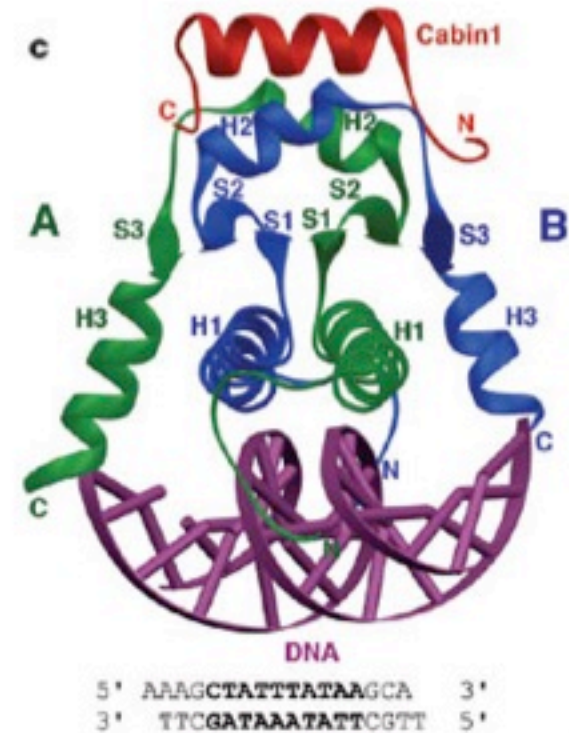
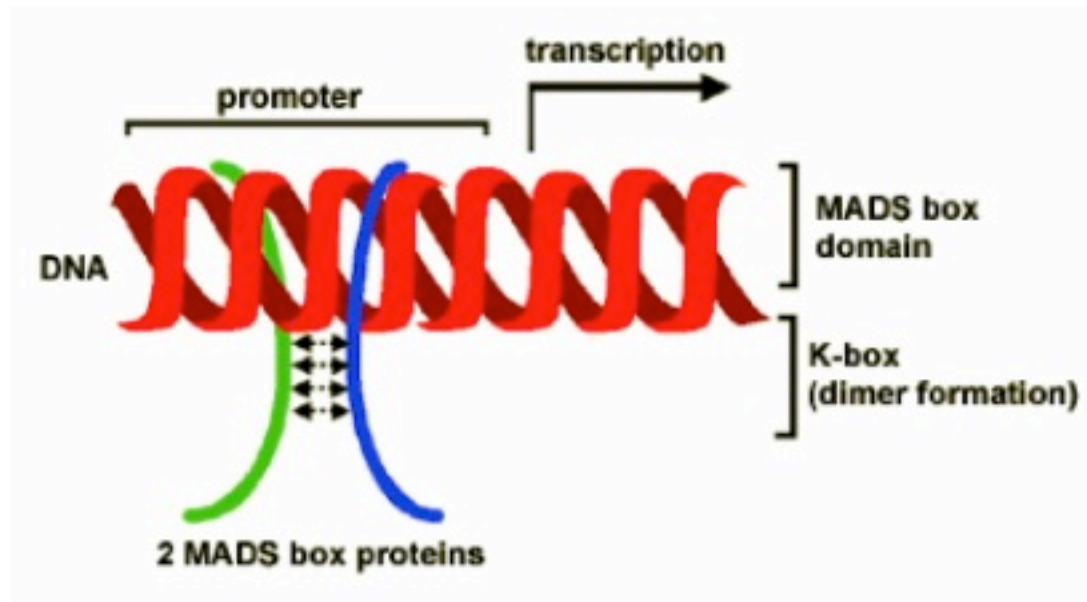


MADS-Box Transkriptionsfaktoren



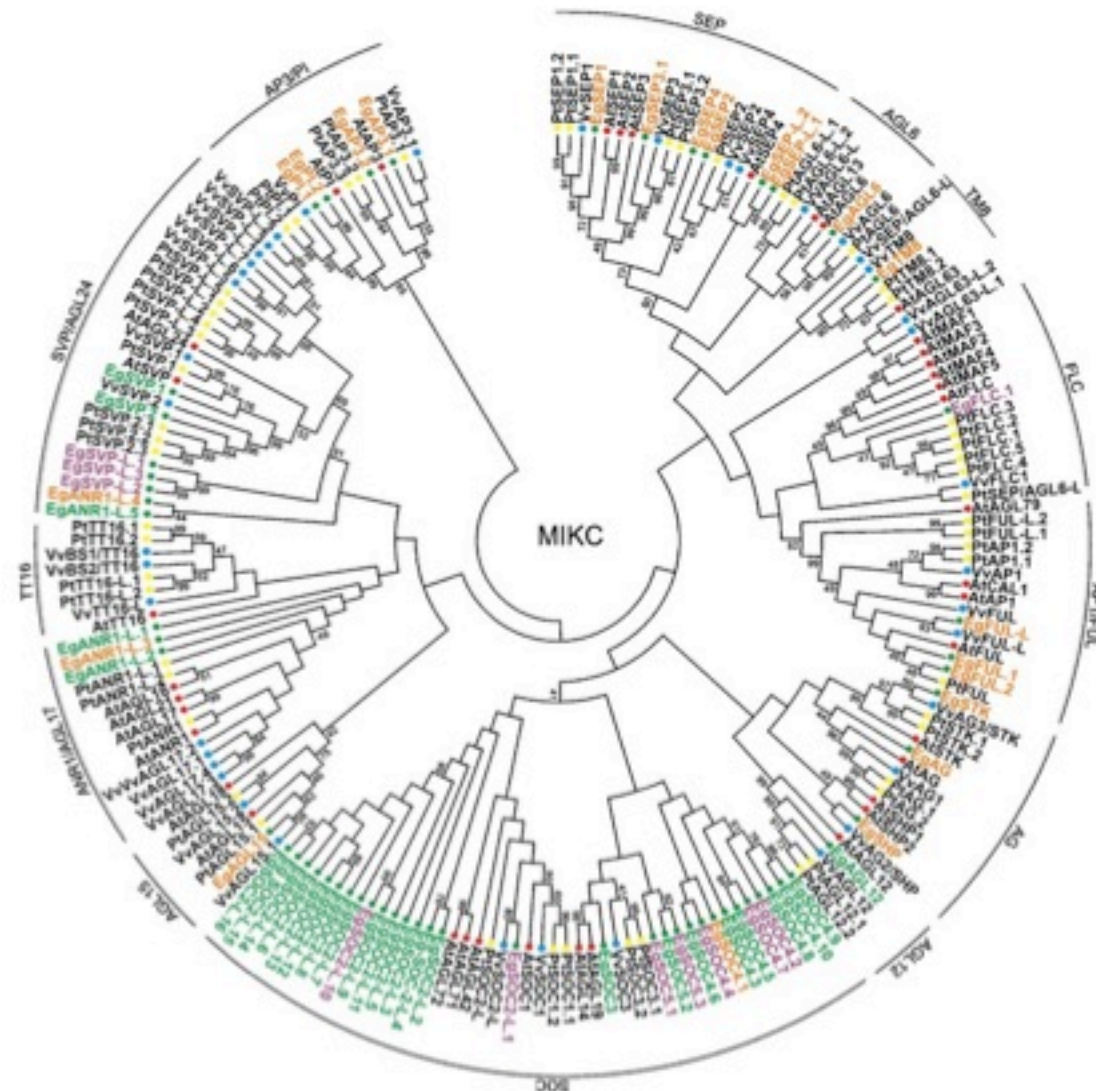
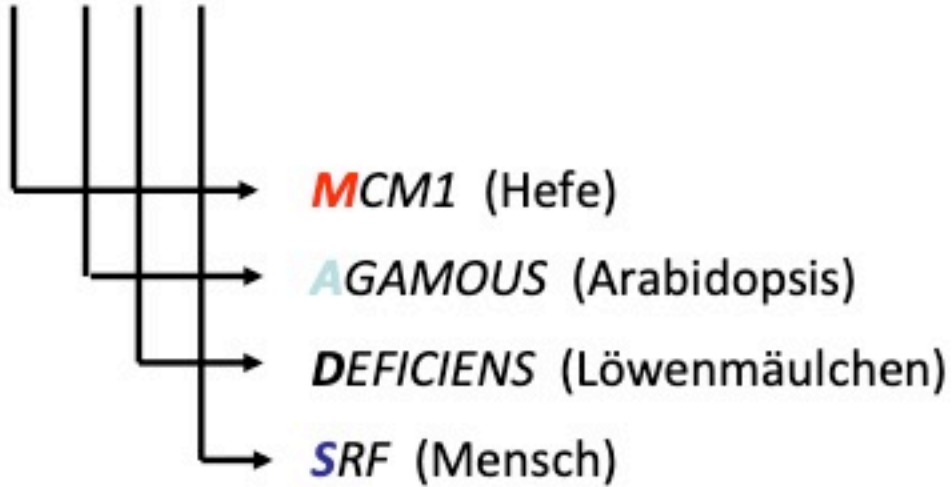
Dimerisierung

Multimerisierung
Aktivierung
weitere Aufgaben ?



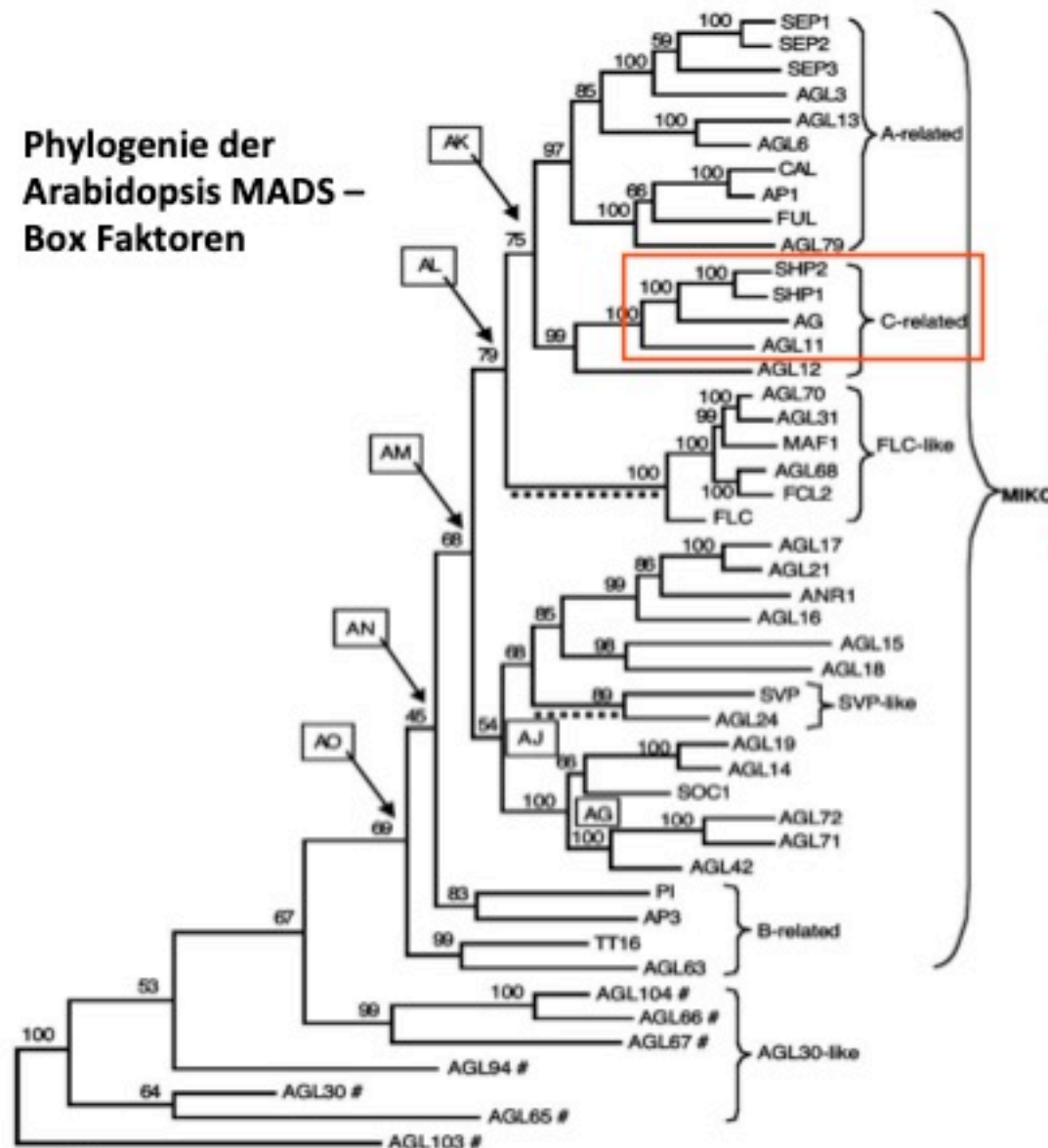
MADS-Box Transkriptionsfaktoren

M A D S-box

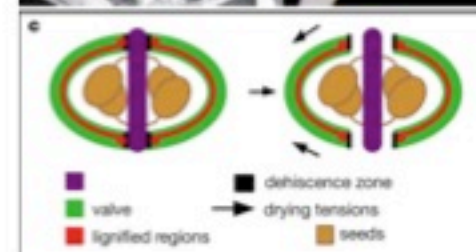
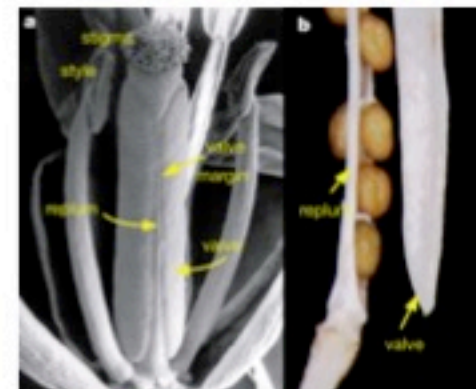
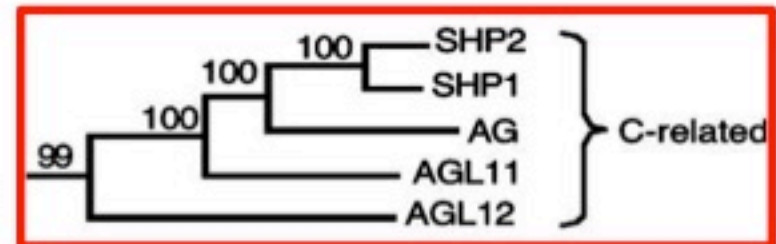


Die AGAMOUS (C-related) Gengruppe

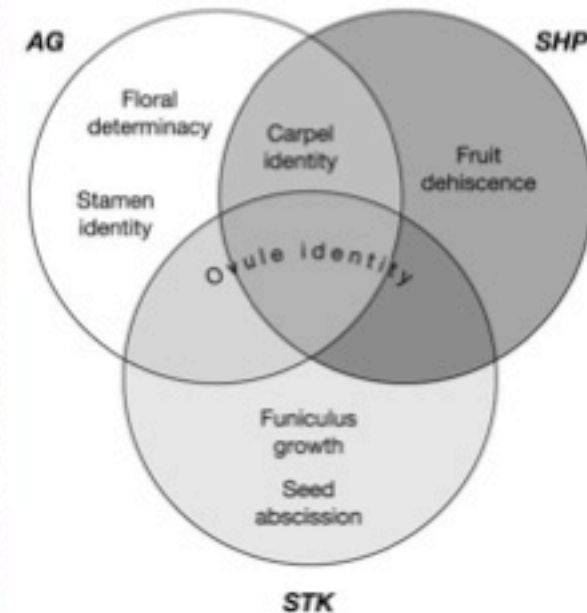
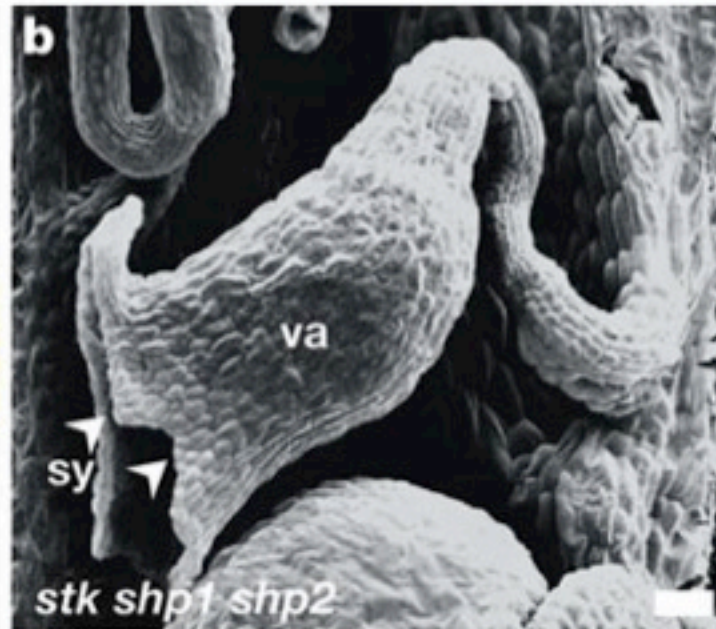
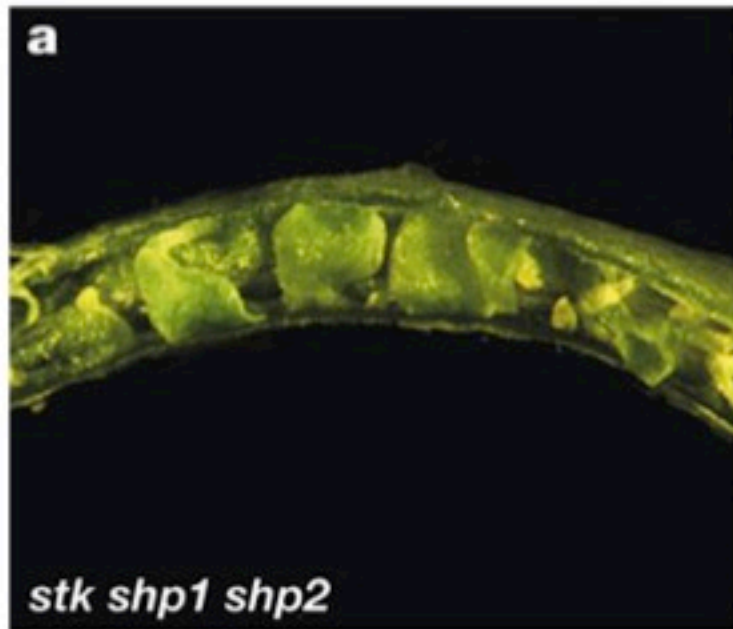
Phylogenie der Arabidopsis MADS – Box Faktoren



SHATTERPROOF 1 und 2 (SHP1 & 2) und SEEDSTICK (STK, auch AGL11 genannt) sind sehr eng mit AGAMOUS verwandt.

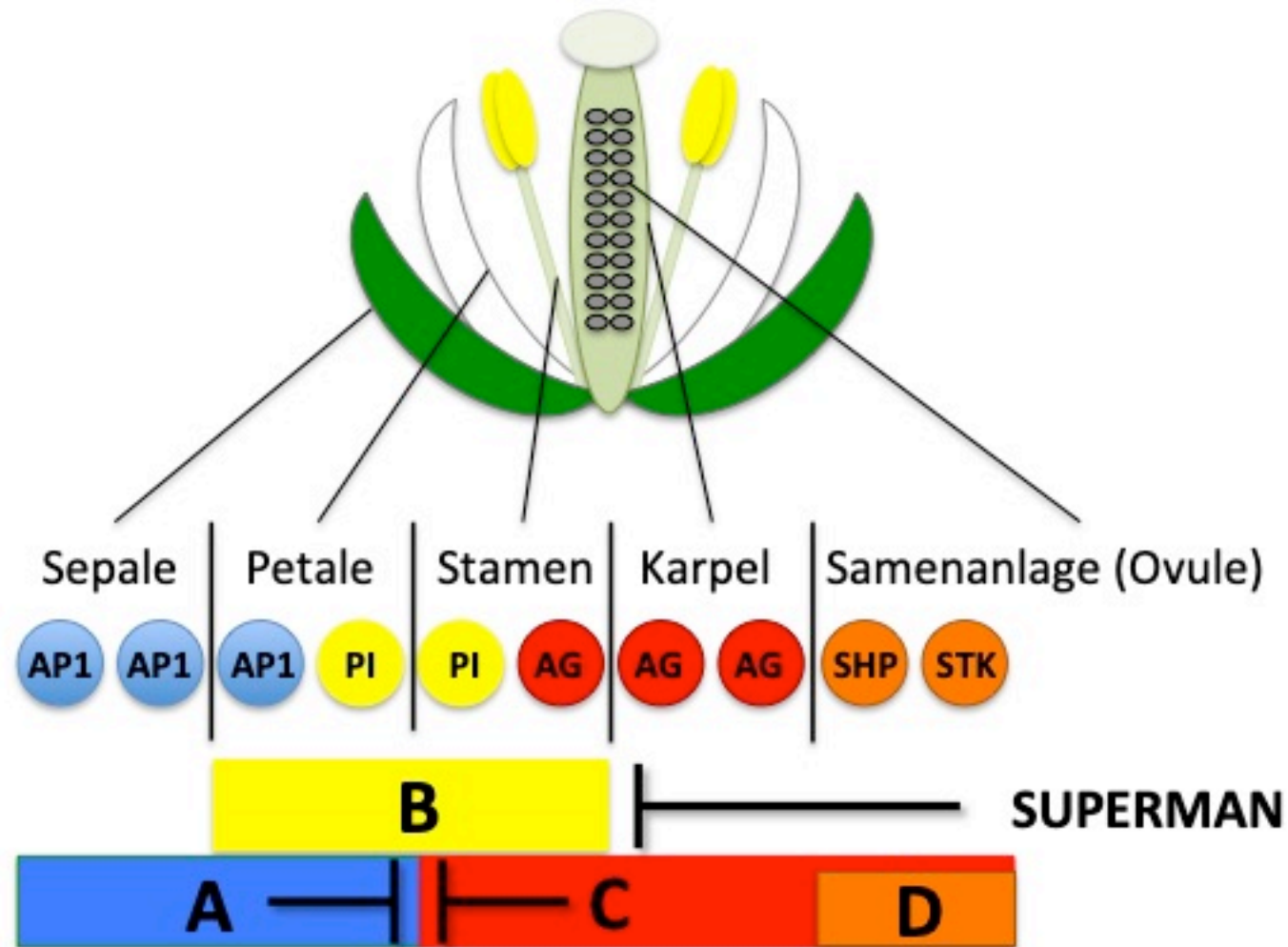


Trippelmutante *stk shp1 shp2*



Die **MADS-Box** Transkriptionsfaktoren **SEEDSTICK** (STK, AGL11) und **SHATTERGROOF 1** und 2 (SHP1 & 2) kontrollieren die **Identität von Samenanlagen**. In der Trippelmutante *stk shp1 shp2* werden die Integumente in Fruchtblatt-ähnliche Strukturen umgewandelt und die Entwicklung des weiblichen Gametophyten ist nach der Megasporogenese arretiert.

Das A-B-C-D Modell





Konzepte der Vorlesung Blütenentwicklung

Das Blüten-ABC Modell

**Erweiterungen des ABC Modells:
Superman & "D"**

Das "E" Modul



Wildtyp

Dreifachmutante

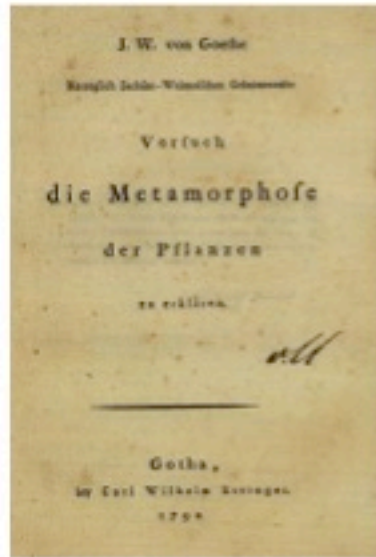


Wildtyp



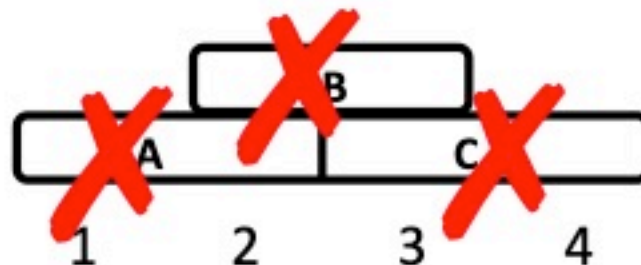
apetala - agamous - pistillata

Blüten aus Sproßblättern



Felder:

Wirtel:



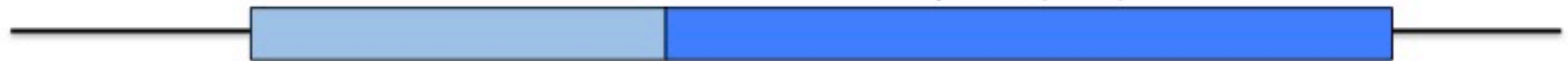
Sind Blüten umgewandelte Blätter? – Ja, Goethe hatte recht.

Notwendig oder hinreichend?



Ektopische Expression der ABC Transkriptionsfaktoren

kodierende Sequenz (CDS) von **APETALA1**



Promoter von **APETALA1**

Notwendig oder hinreichend?



Ektopische Expression der ABC Transkriptionsfaktoren



Notwendig oder hinreichend?



Ektopische Expression der ABC Transkriptionsfaktoren

kodierende Sequenz (CDS) von **APETALA1**



Notwendig oder hinreichend?



Ektopische Expression ABC Transkriptionsfaktoren



kodierende Sequenz (CDS) von **APETALA1**

starker und ubiquitär exprimierter
Promoter des Blumenkohlmosaikvirus
(PRO35S-CaMV)

Notwendig oder hinreichend?



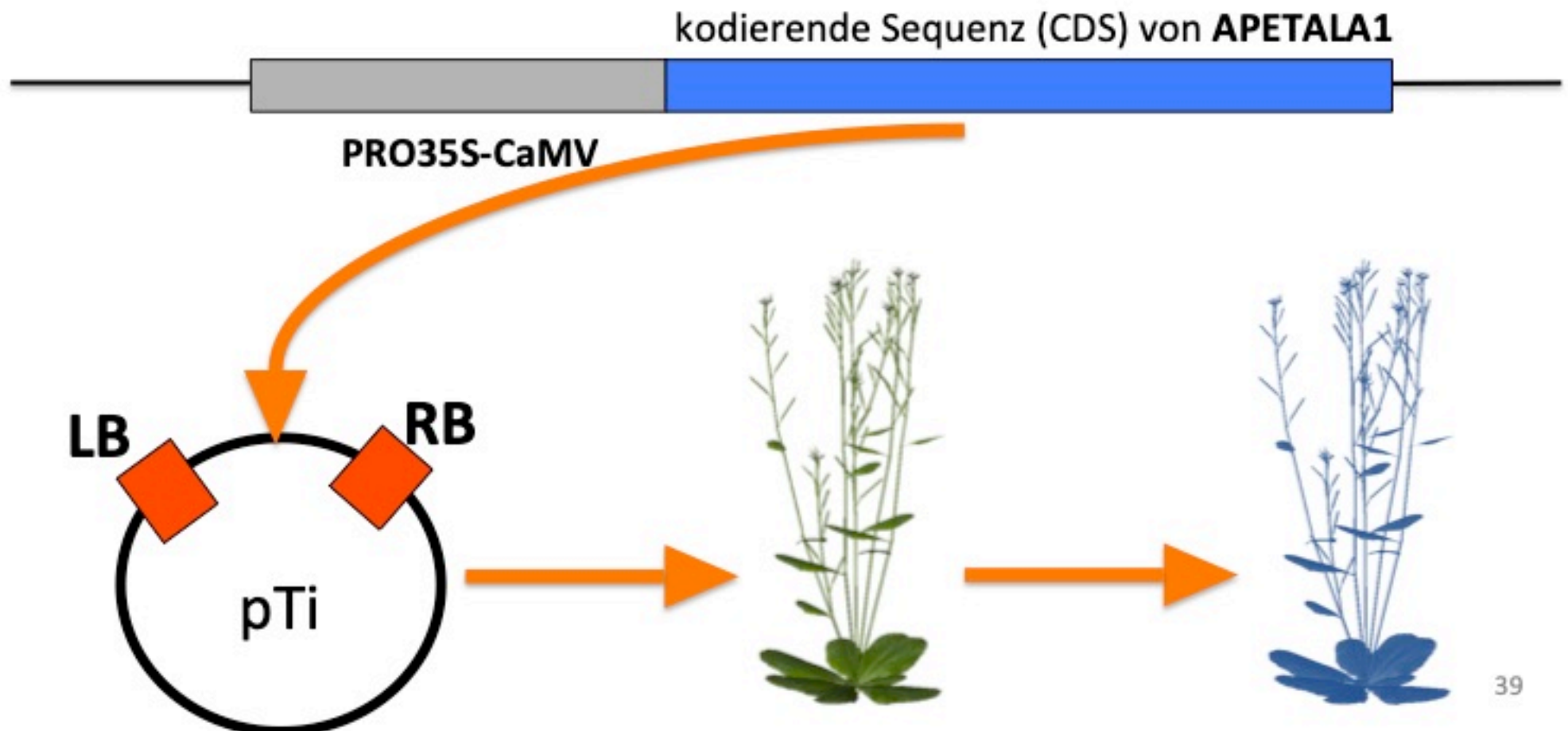
Ektopische Expression der ABC Transkriptionsfaktoren

kodierende Sequenz (CDS) von **APETALA1**

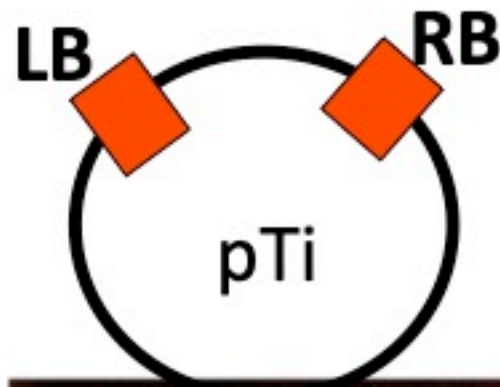


**starker und ubiquitär exprimierter
Promoter des Blumenkohlmosaikvirus
(PRO35S-CaMV)**

Ektopische Expression der ABC Transkriptionsfaktoren



Ektopische Expression der ABC Transkriptionsfaktoren



PRO35S-CaMV



APETALA1

PRO35S-CaMV



APETALA3/PISTILLATA

PRO35S-CaMV



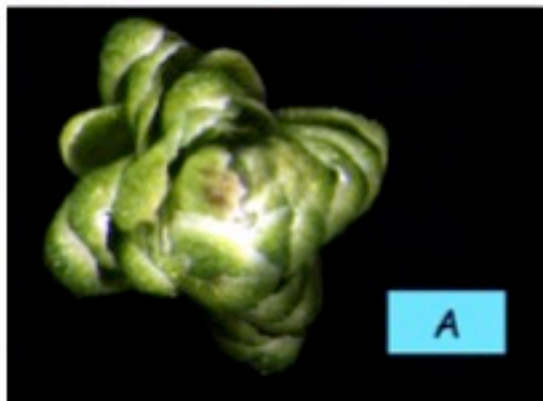
AGAMOUS

Ektopische Expression von APETALA 1

PRO35S-CaMV

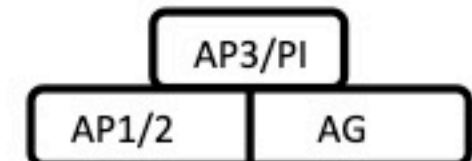


APETALA1



Wildtyp

Felder:



Wirtel:

Se Pe St Ca

35S:AP1

Felder:



Wirtel:

Se Se Se Se

→ **APETALA 1** ist nicht nur **notwendig**, sondern auch **ausreichend**, um das Entwicklungsprogramm der **Kelchblätter** zu starten

→ ABER: **ektopische Kelchblätter** gibt es nicht

Gemeinsame ektopische Expression von APETALA 1 und APETALA 3/PISTILLATA

PRO35S-CaMV



APETALA3/PISTILLATA

PRO35S-CaMV

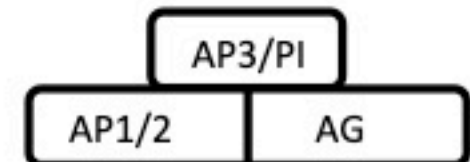


APETALA1



Wildtyp

Felder:



Wirtel:

Se Pe St Ca

35S:AP1 + 35S:AP3/PI

Felder:



Wirtel:

Pe Pe Pe Pe

→ APETALA 1 und PISTILLATA/APETALA 3 sind nicht nur **notwendig**, sondern auch **ausreichend**, um **gemeinsam** das Entwicklungsprogramm der **Blütenblätter** zu starten

→ ABER: ektopische Blütenblätter gibt es nicht

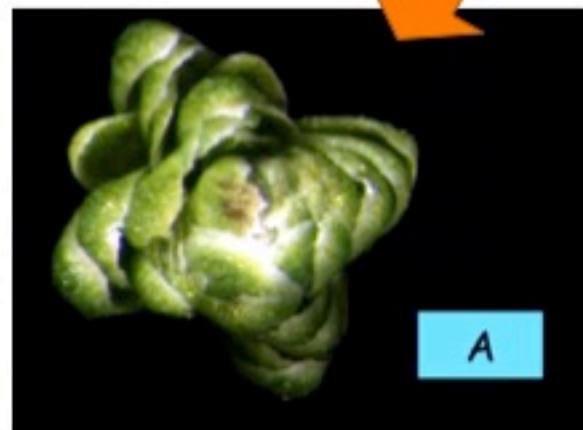
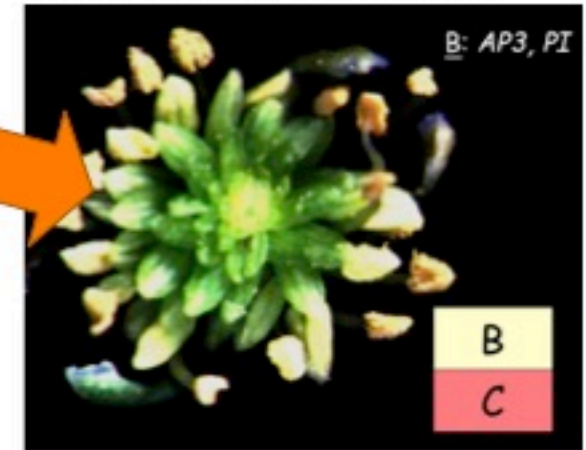
abc Mutante



+ 35S AP1 + 35S AP3/PI



+ 35S AP3/PI + 35S AGI



+ 35S AP1



+ 35S AG

Identifikation von Kofaktoren: Das Hefe-2-Hybrid-System



BD	Bindedomäne - binding domain
DM/ID	Dimerisierungsdomäne/Interaktionsdomäne
NLS	nuclear localisation signal - Kern Lokalisationssignal
AD	Aktivierungsdomäne - activation domain



Typische Bindedomänen

Helix turn Helix
Helix Loop Helix; b HLH
Zink Finger
Homeobox

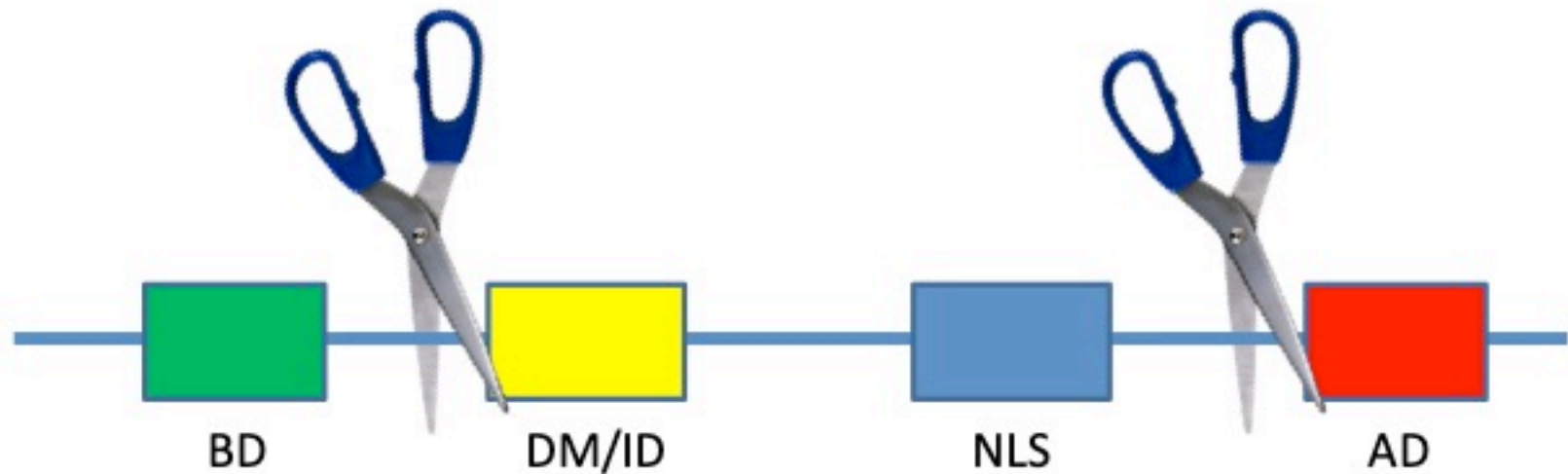
Dimerisierungsdomäne

Leucin Zipper

Aktivierungsdomäne

„Sauer“ geladene Region
(ASP GLU),
Prolin reich

Identifikation von Kofaktoren: Das Hefe-2-Hybrid-System



Typische Bindedomänen

Helix turn Helix
Helix Loop Helix; b HLH
Zink Finger
Homeobox

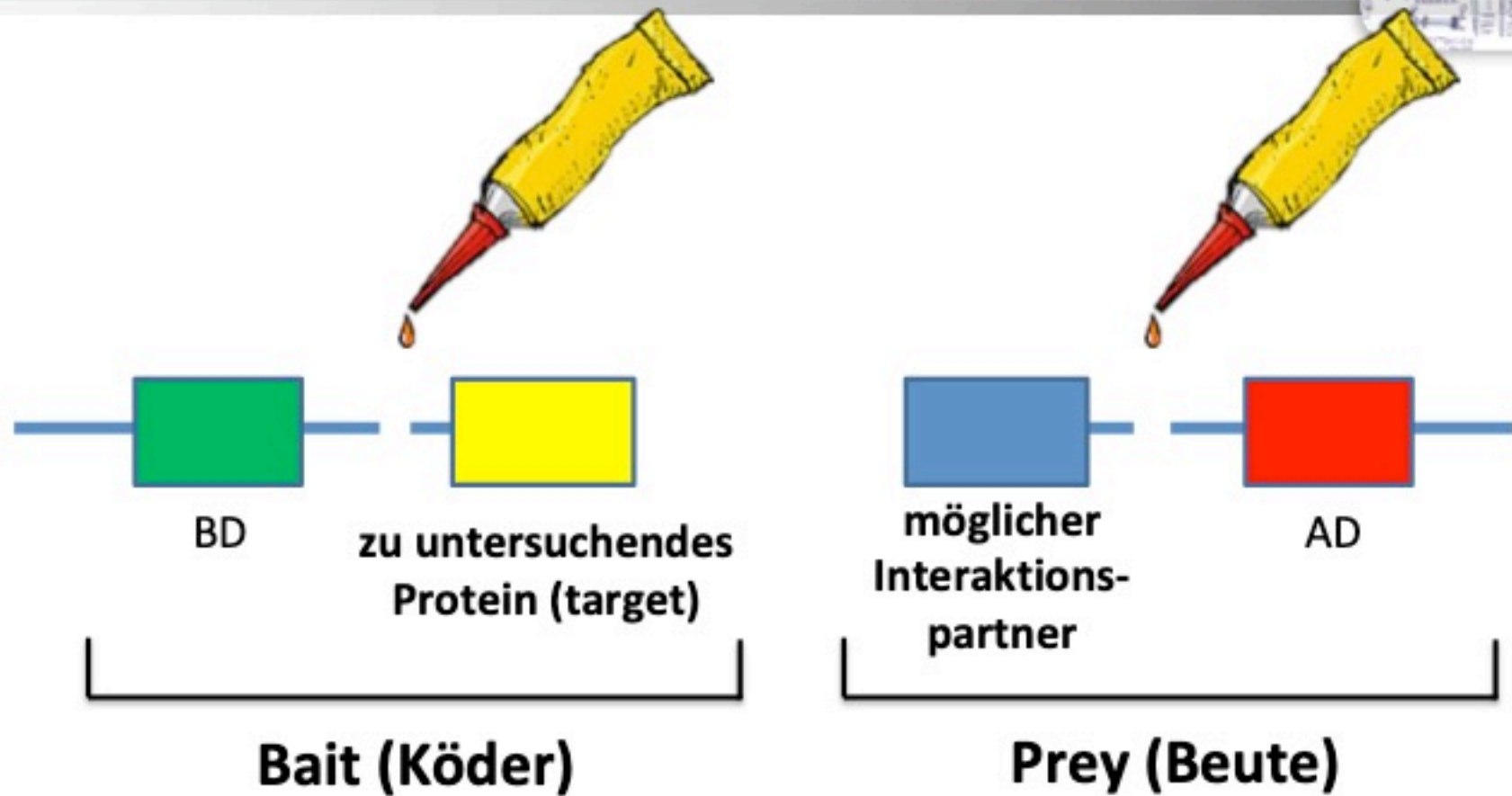
Dimerisierungsdomäne

Leucin Zipper

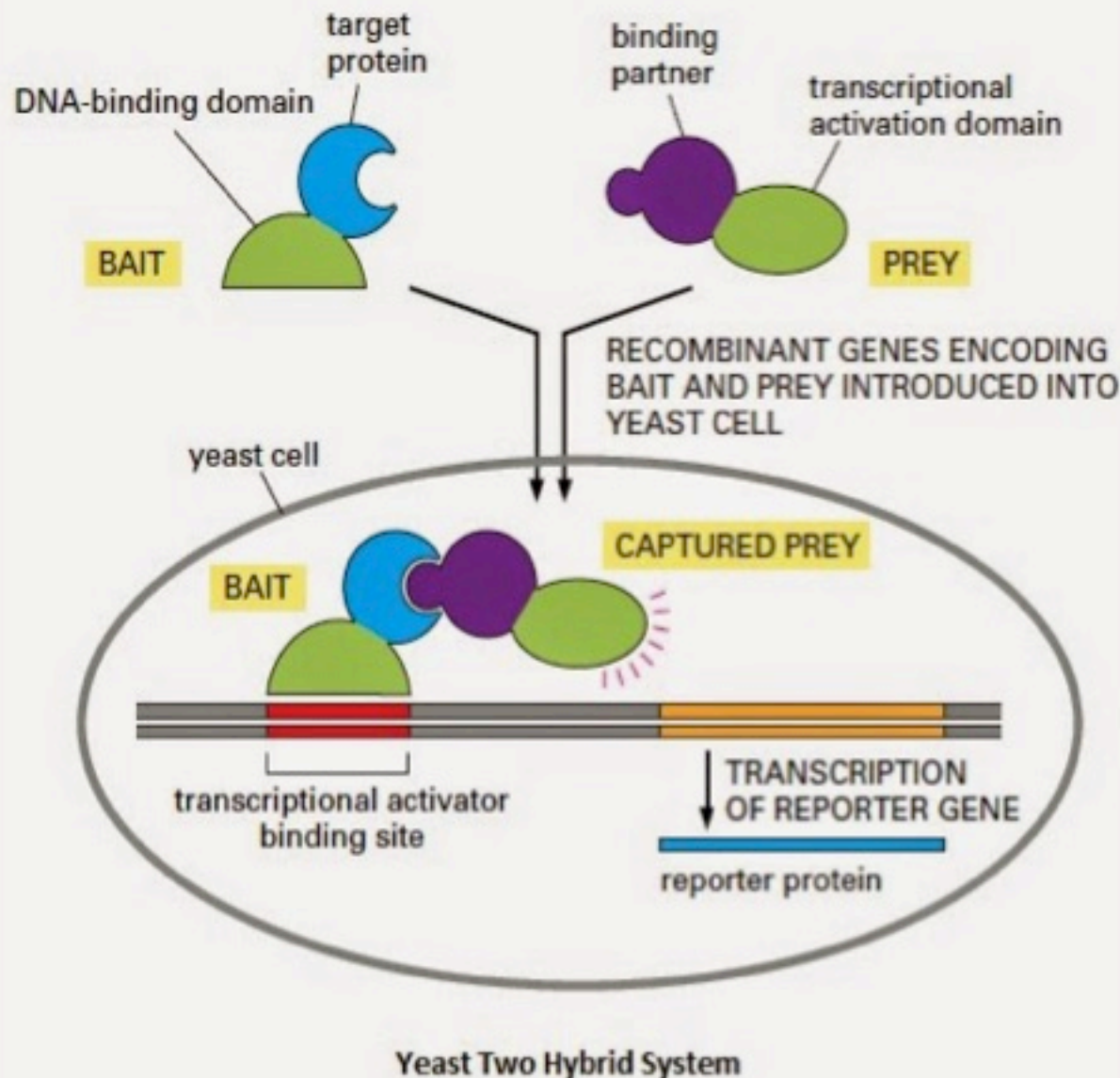
Aktivierungsdomäne

„Sauer“ geladene Region
(ASP GLU),
Prolin reich

Identifikation von Kofaktoren: Das Hefe-2-Hybrid-System

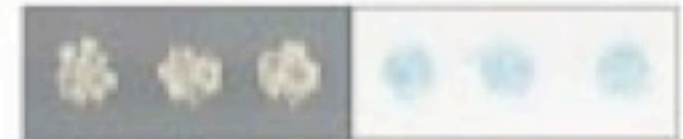


Identifikation von Kofaktoren: Das Hefe-2-Hybrid-System



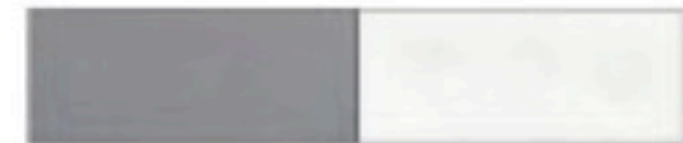
Es gibt Interaktion/Bindung der untersuchten Proteine:

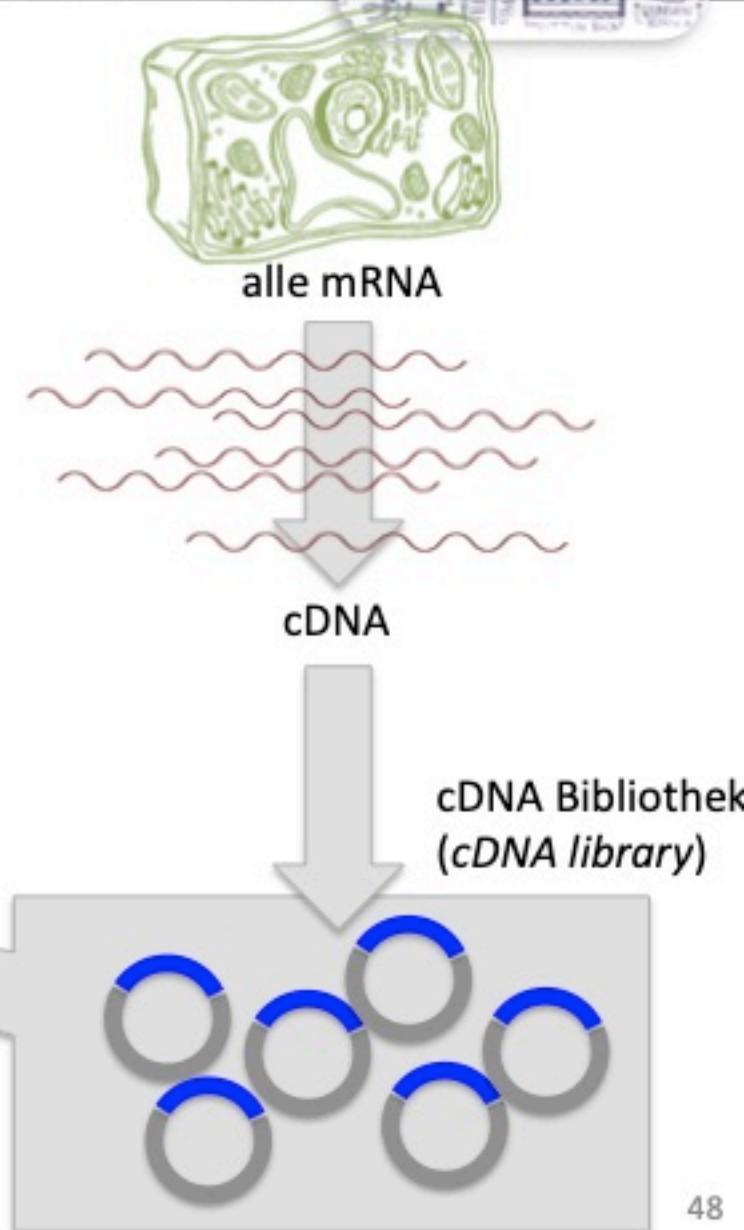
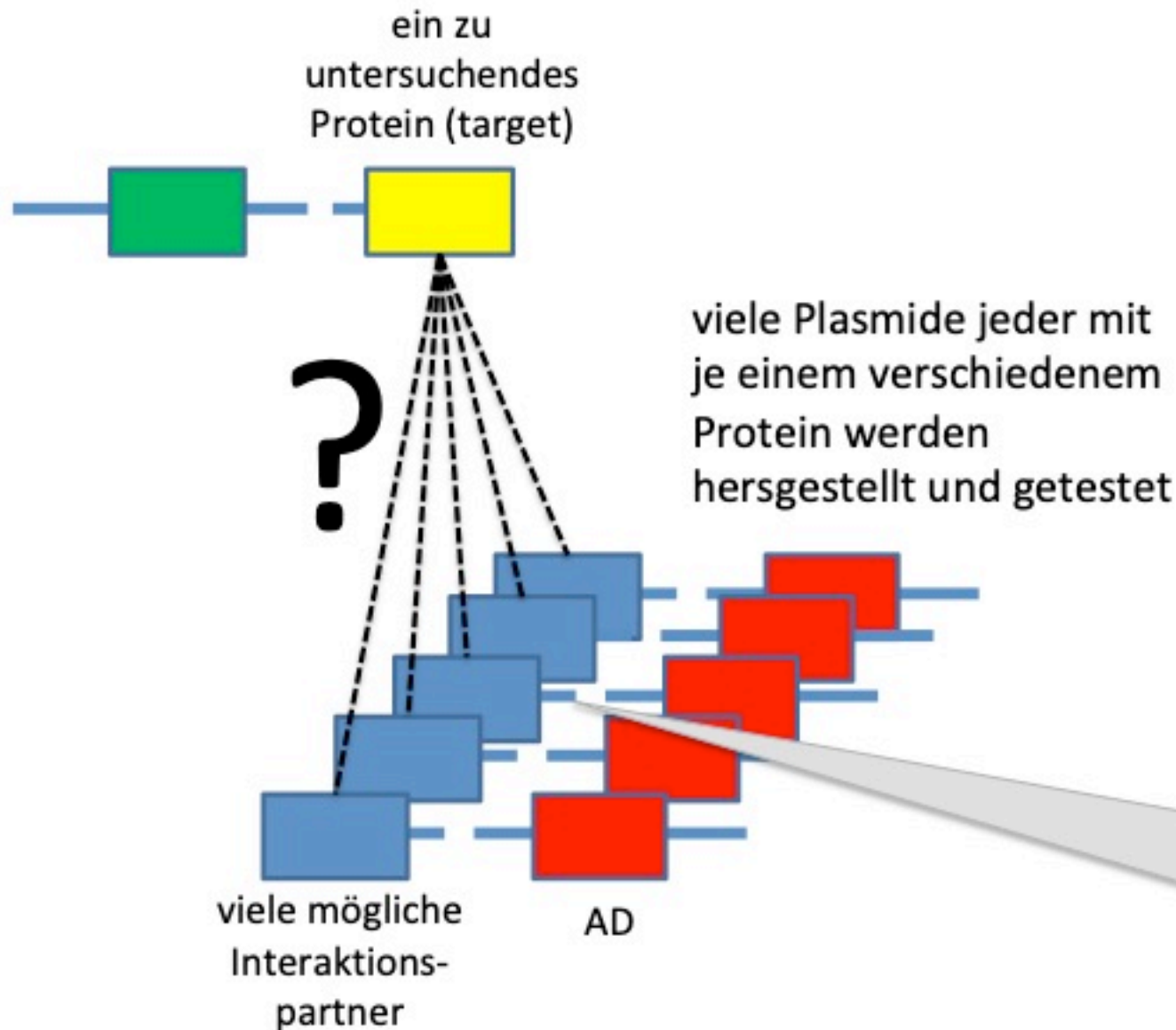
Leucin Biosyntheseweg wieder funktional, **Wachstum auf Platten ohne Leucin** und/oder ein **Farbreporter** (beta-Galactosidase) wird exprimiert. (**ABER:** Interaktion im Y2H kann auch falsch positiv sein! Zweiter Test nötig!)



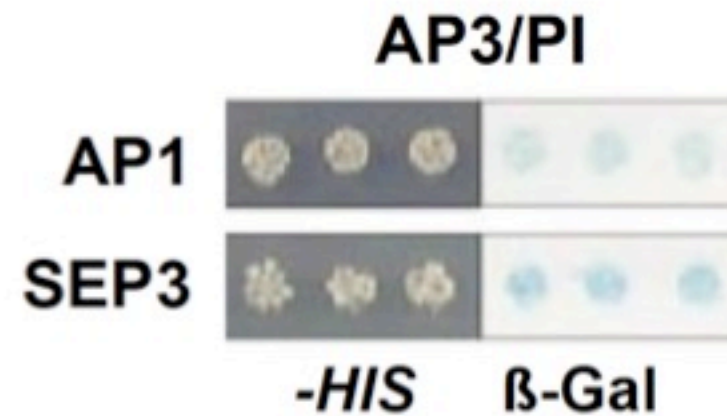
Keine Interaktion/Bindung:

kein **Wachstum auf Platten ohne Leucin** und/oder kein **Färbereaktion**. (**ABER:** Keine Interaktion im Y2H heißt nicht unbedingt keine Interaktion *in vivo*!)





ABC Proteine interagieren mit SEPALATA

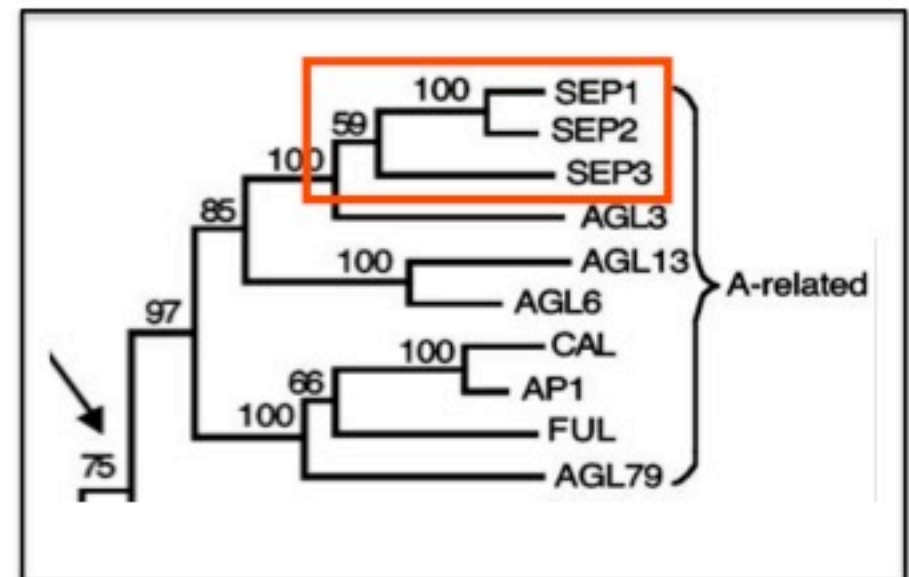
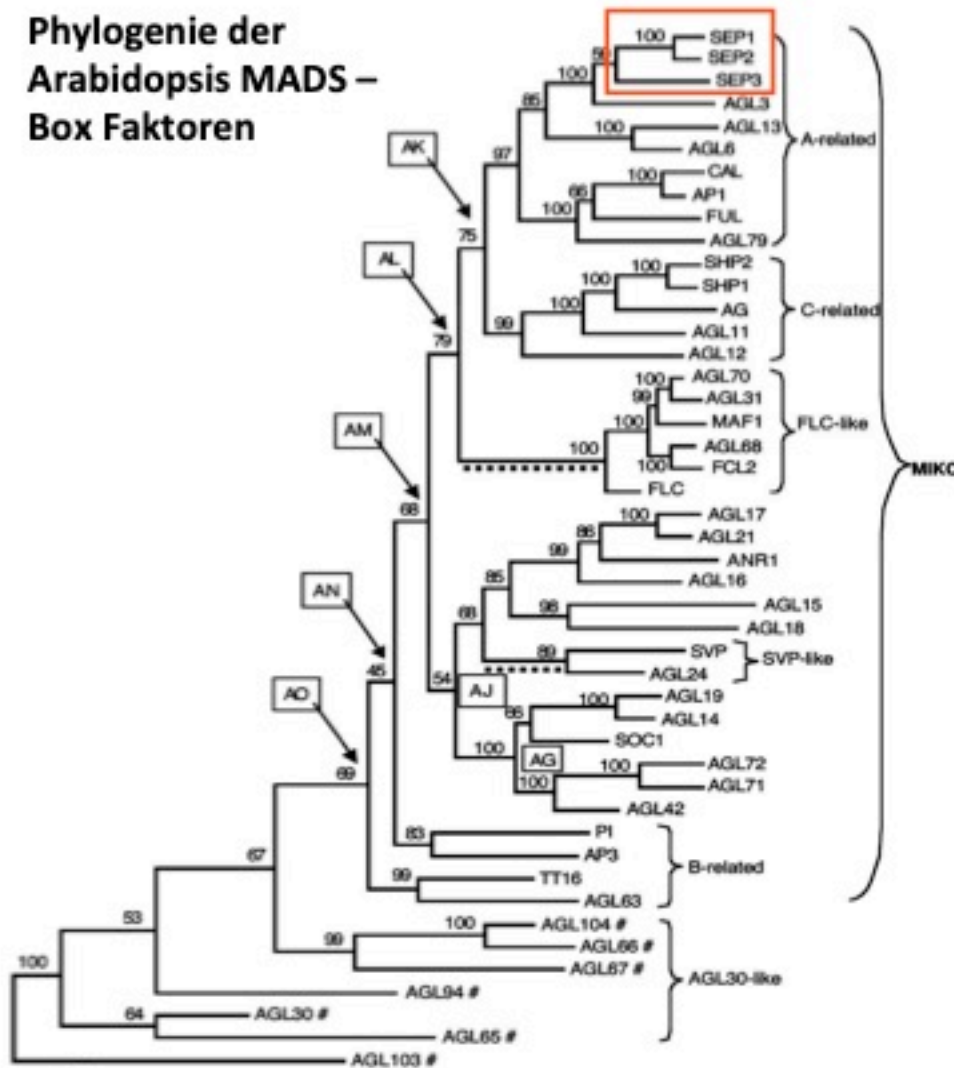


- ➔ **MADS Transkriptionsfaktoren bilden Komplexe mit SEPs (auch MADS)**
- ➔ **Was ist der mutante Phänotyp von *sep*?**

Die SEPALATA Gengruppe

Einzelmutanten in **SEPALATA** (**SEP**) Genen zeigen keine Abweichung vom Wildtyp

Phylogenie der
Arabidopsis MADS –
Box Faktoren

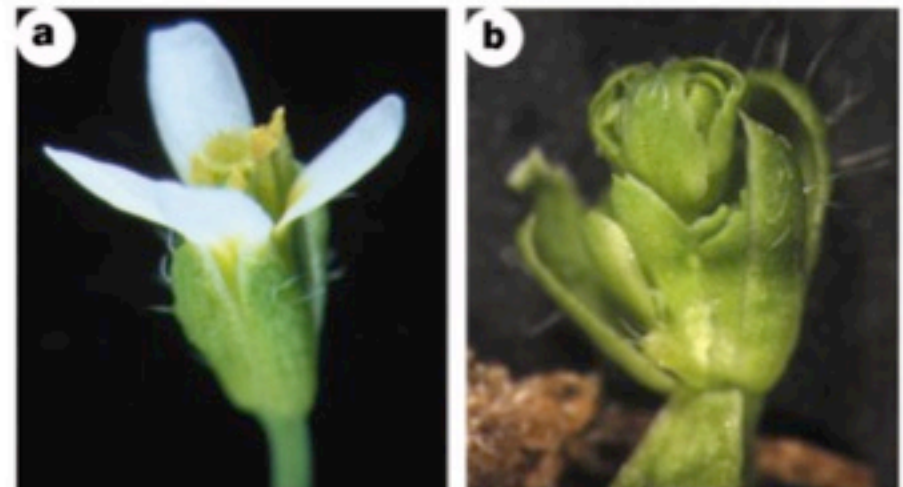


SEPALATA Gene agieren redundant



Dreifachmutante (triple mutant)

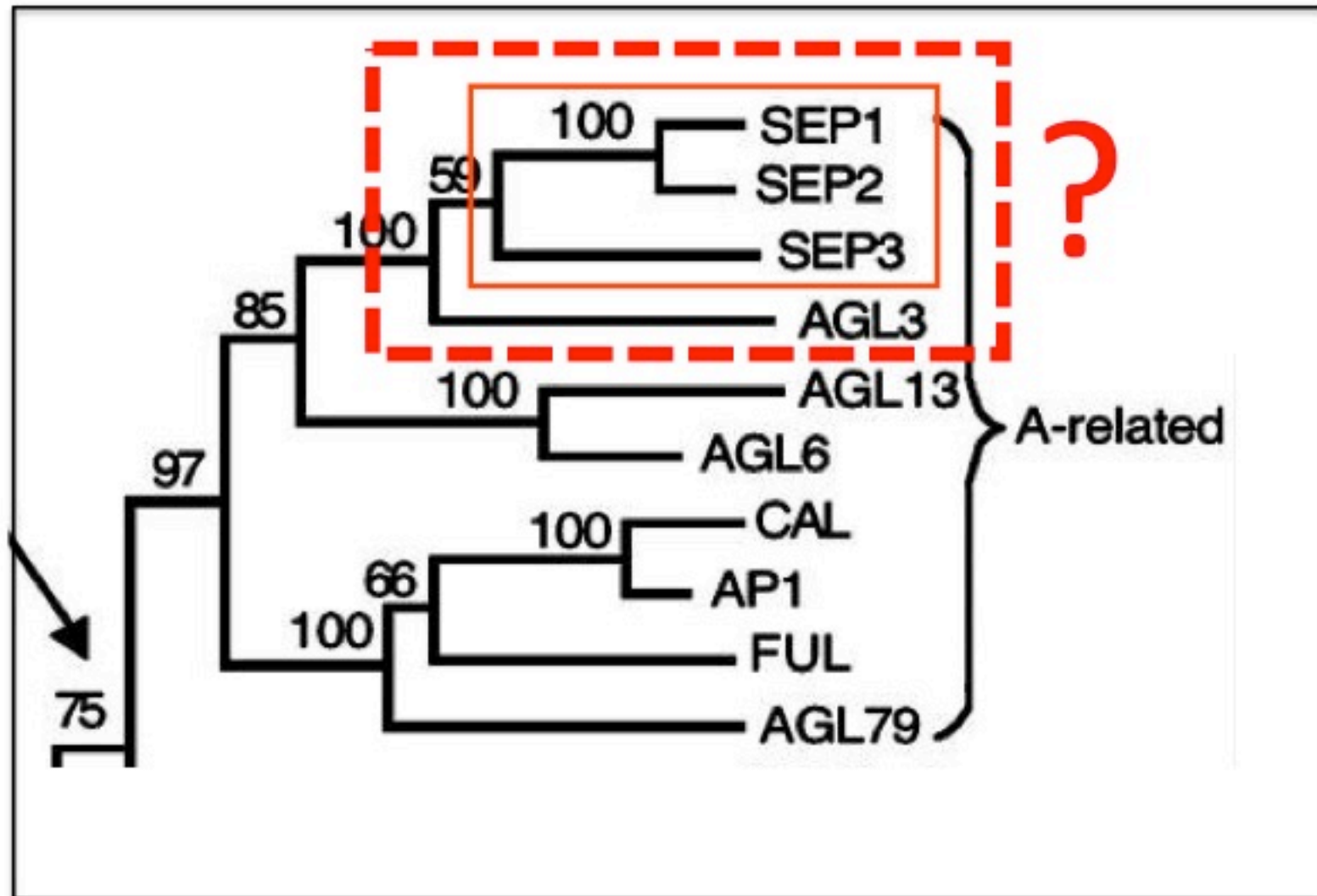
sepallata 1 sepallata 2 sepallata 3
(*sep1 sep2 sep3*)



Wildtyp

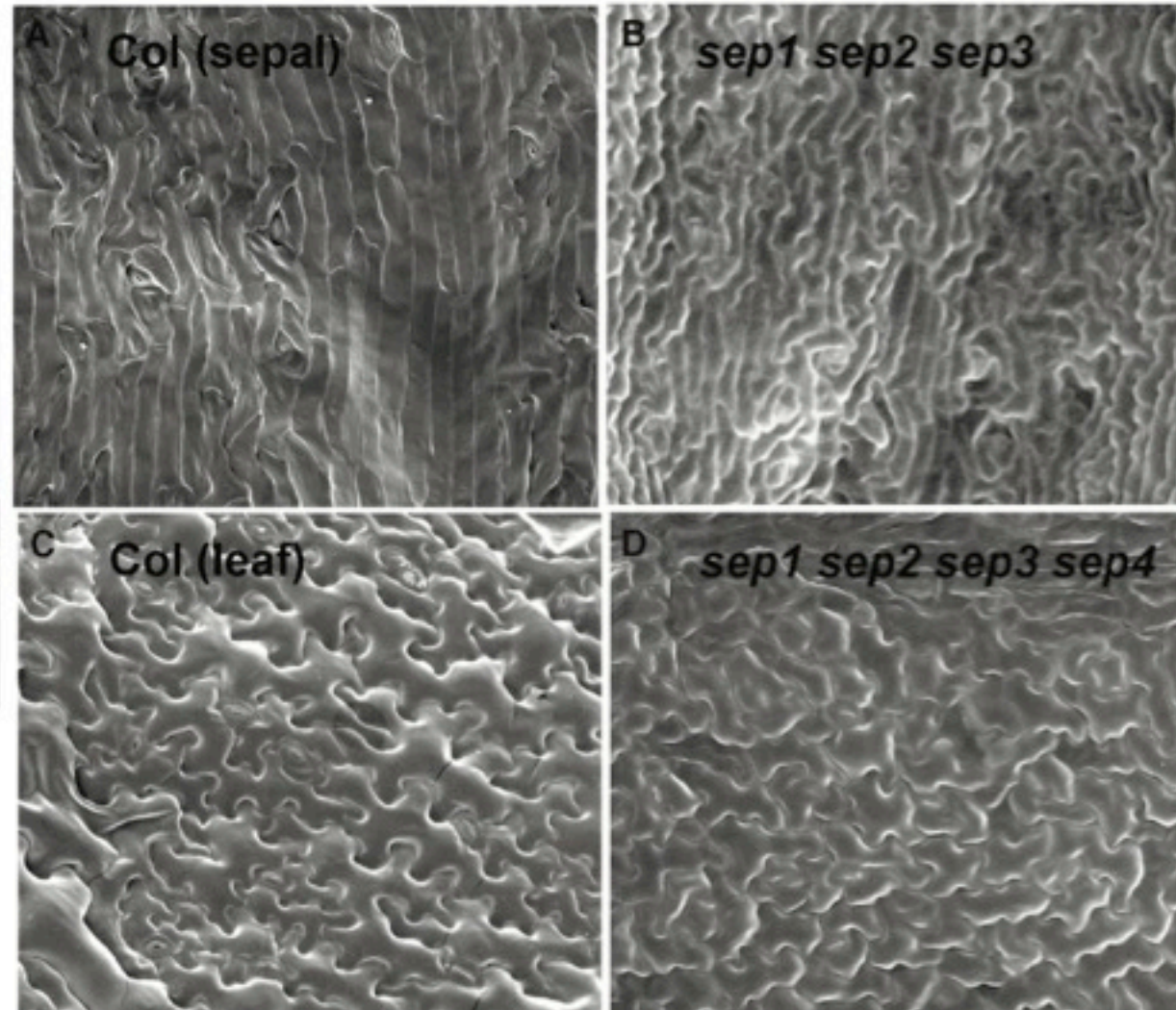
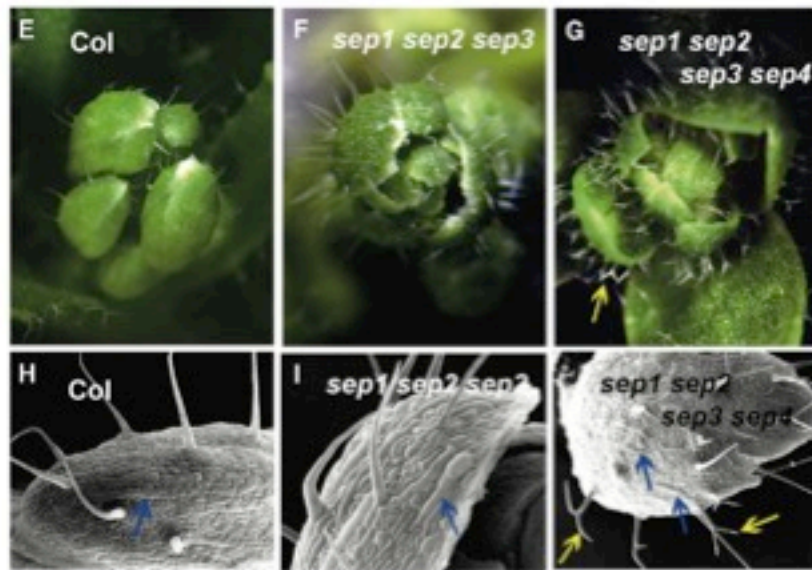
sep1 sep2 sep3

Wait a minute... Gibt es auch Redundanzen von SEP1-3 mit AGL3?



Die *sep1 sep2 sep3 agl 3* Vierfachmutante

- *sep1 sep2 sep3 agl 3* (quadruple mutant) zeigt Blütenorgane die gänzlich in Blattorgane transformiert sind
- Umbenennung von *AGL3* in *SEP4*.



Nochmal Blüten aus Sproßblättern



Felder:

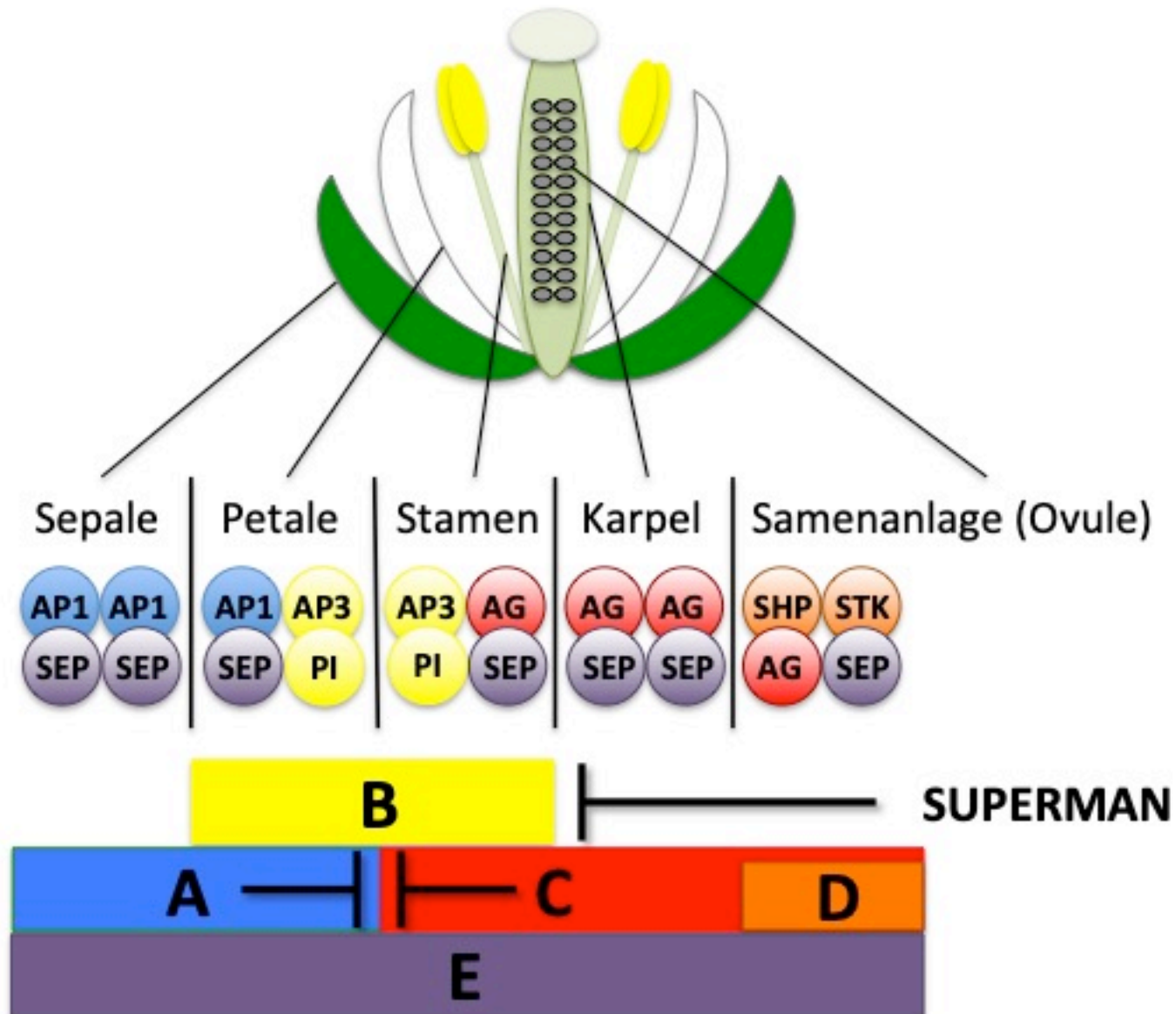


Wirtel:

1 2 3 4

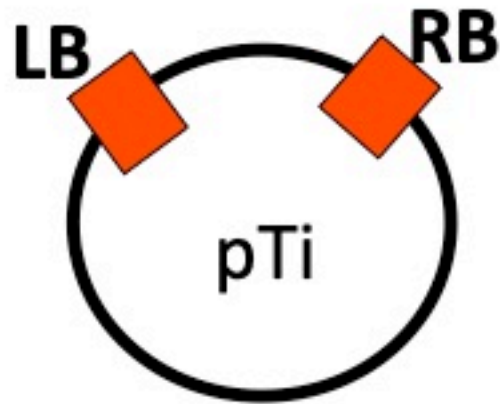
Sind Blüten umgewandelte Blätter? – Ja, Goethe hatte recht.

Das A-B-C-D-E Modell



Der ultimative Test

Ektopische Expression der **ABC+D** Transkriptionsfaktoren



PRO35S-CaMV



APETALA1

PRO35S-CaMV



APETALA3/PISTILLATA

PRO35S-CaMV



AGAMOUS

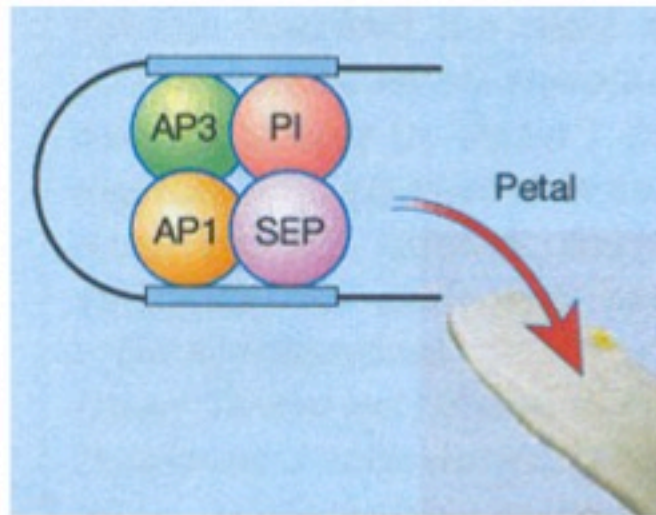
+

PRO35S-CaMV



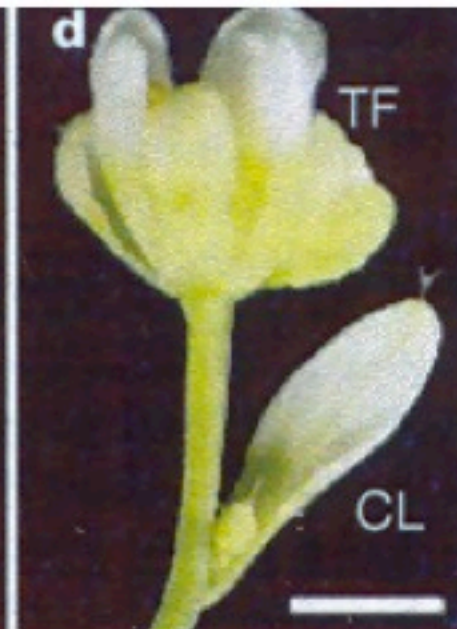
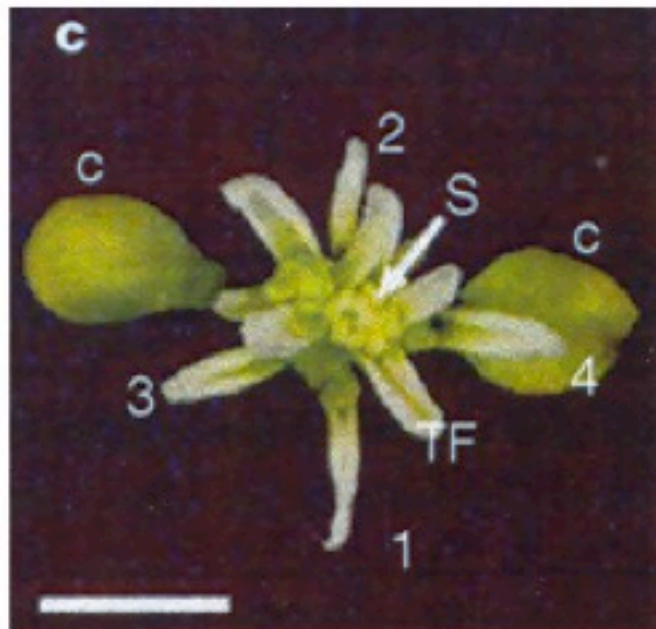
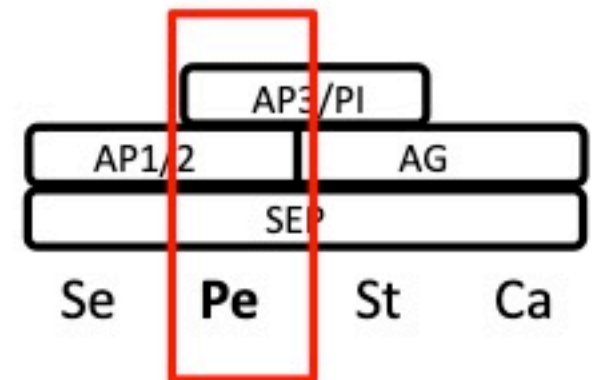
SEPALATA

Ektopische Expression von AP1, AP3, PI und SEP (A, B und E Genen)

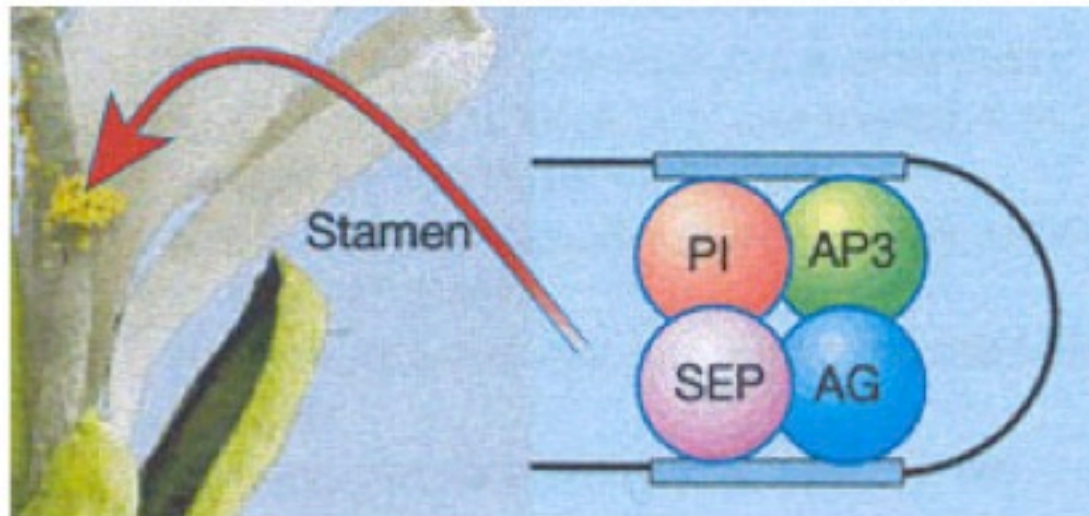


Felder:

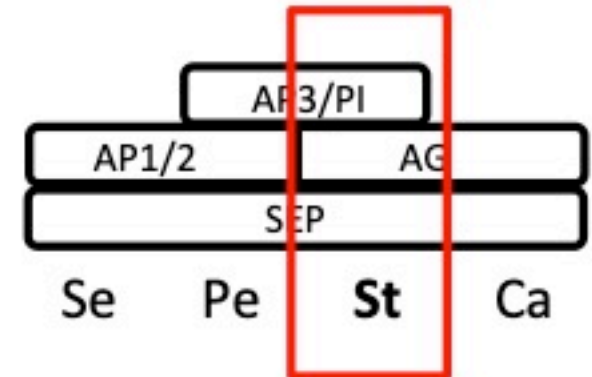
Wirtel:



Ektopische Expression von AP3, PI, AG und SEP (B, C und E Genen)

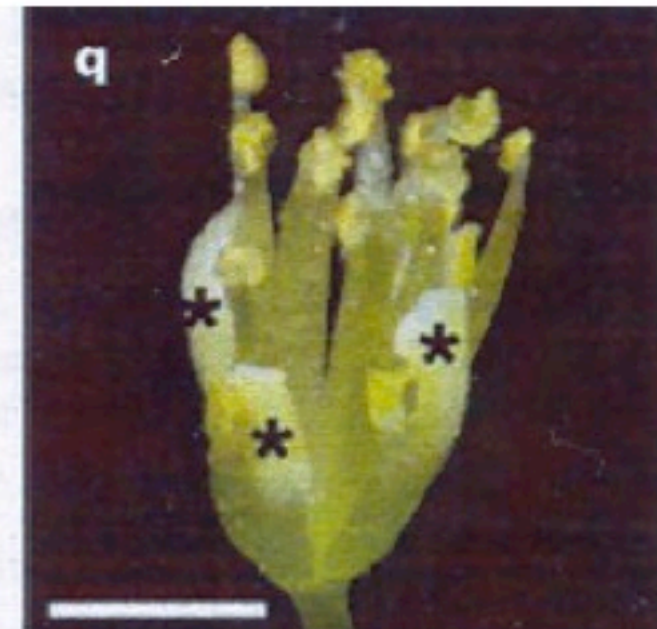
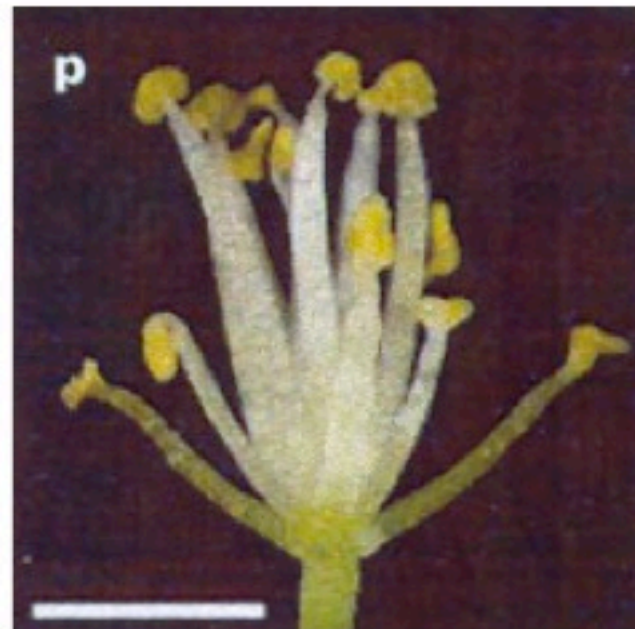


Felder:

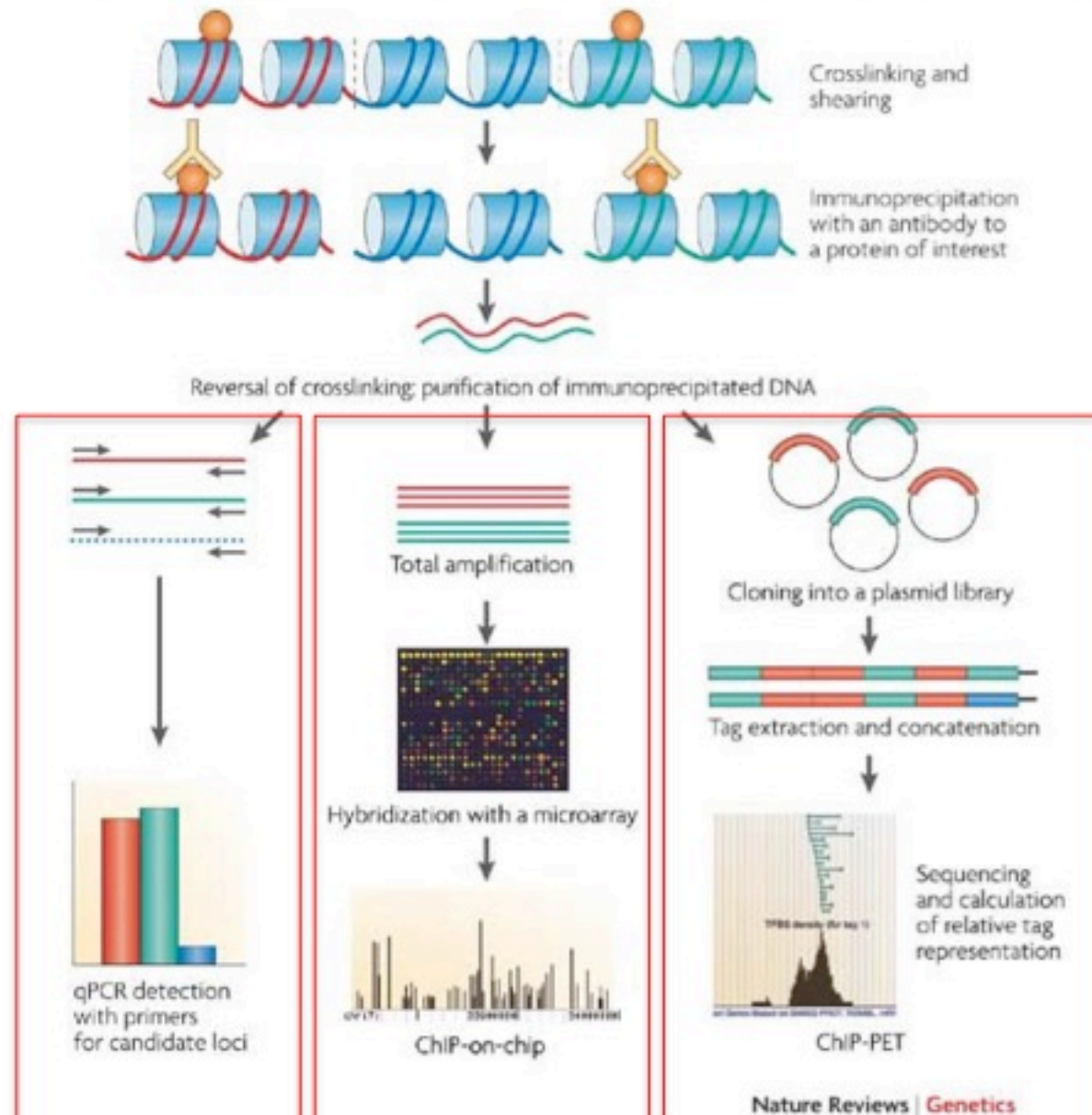


Wirtel:

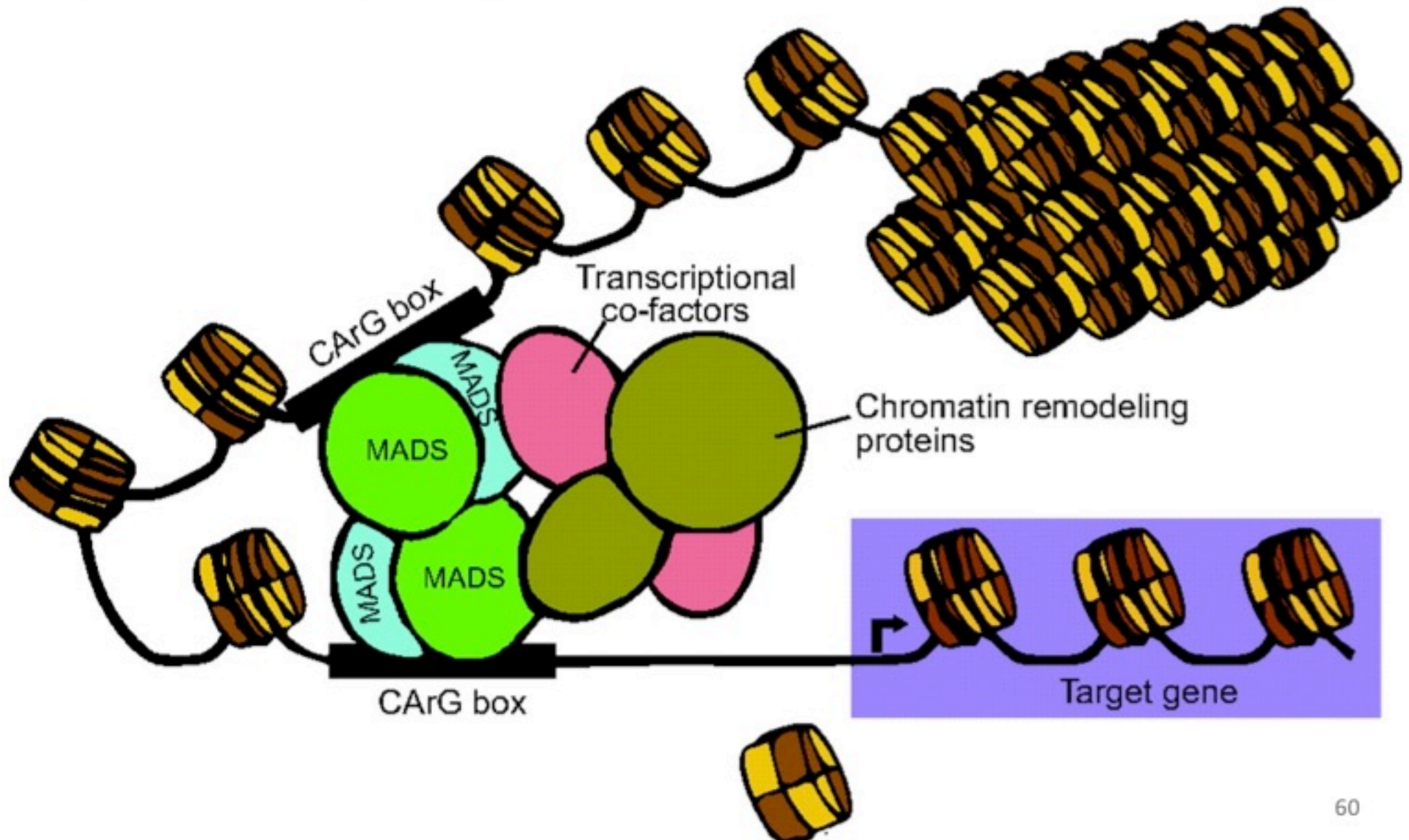
Se Pe **St** Ca



Chromatin-Immuno-Präzipitation (ChIP)



MADS-Box Transkriptionsfaktoren binden an Promotoren mit CArG-Boxen



Konzepte der Vorlesung Blütenentwicklung

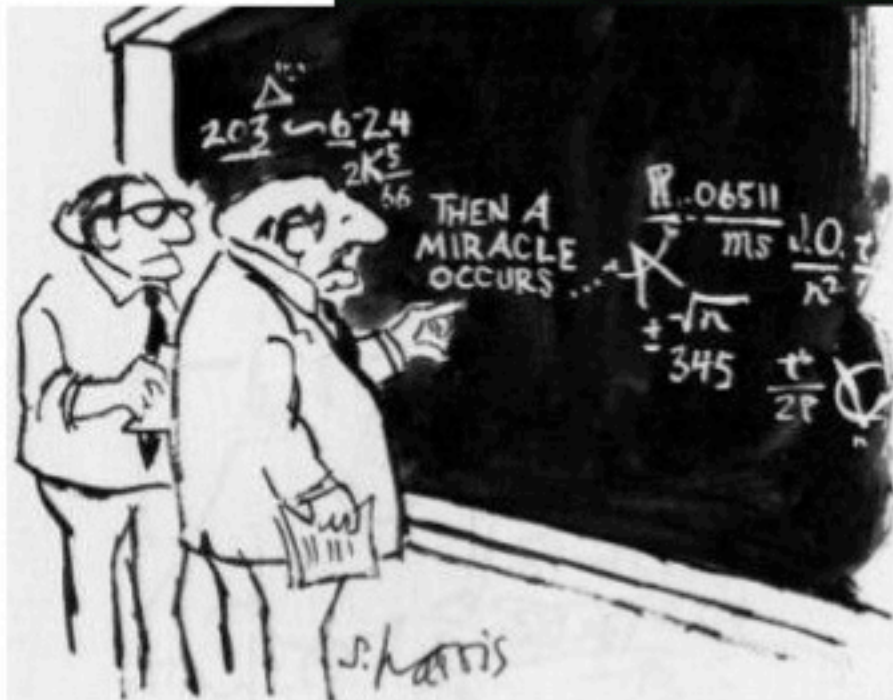
Das Blüten-ABC Modell

**Erweiterungen des ABC Modells:
Superman & "D"**

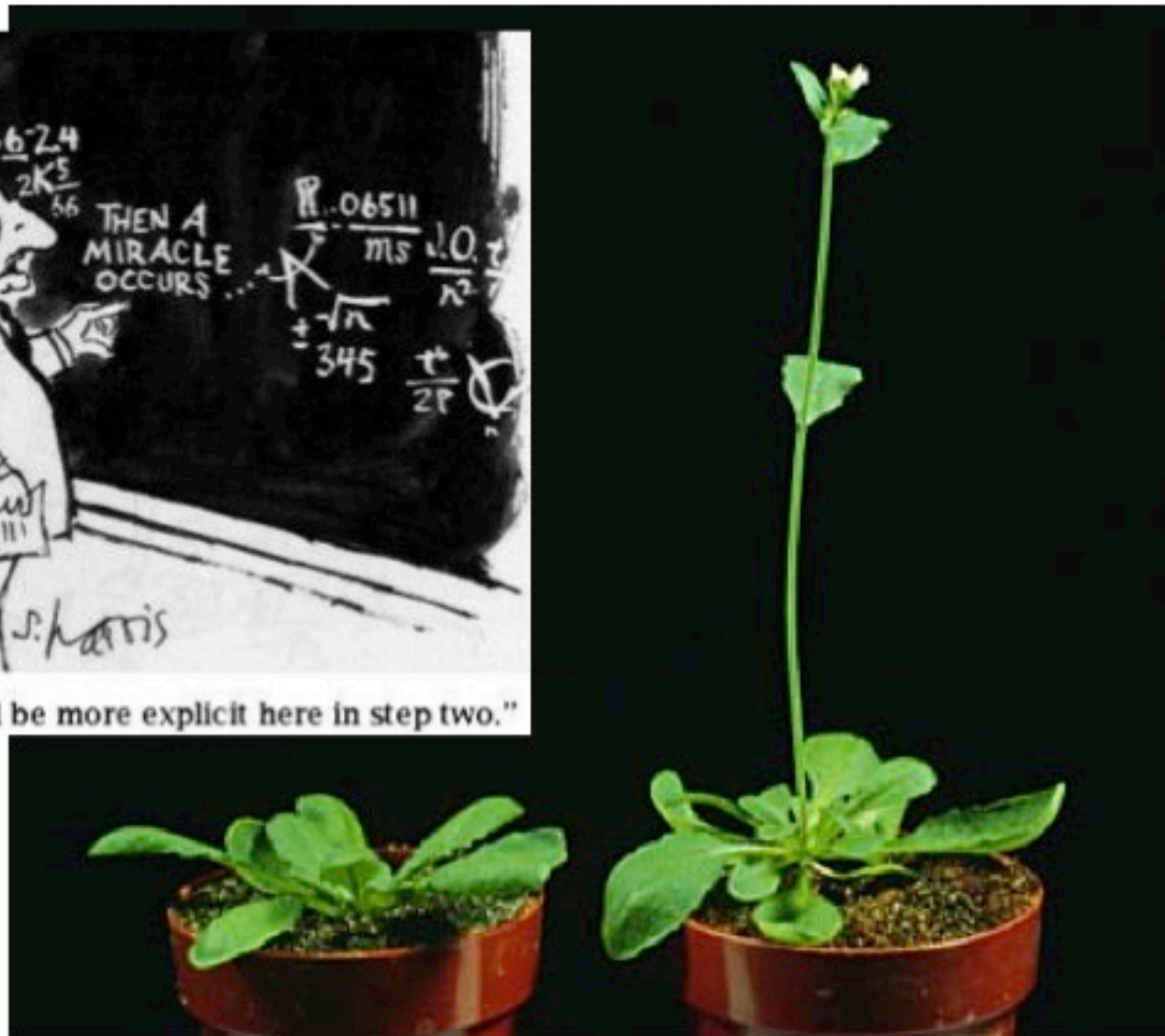
Das "E" Modul

Kontrolle des Blühzeitpunktes

Aus einem vegetativen Meristem wird ein Blütenmeristem



"I think you should be more explicit here in step two."



vegetative Phase

Infloreszenz und Blüte

Interne and externe Signalgeber kontrollieren den Blühzeitpunkt



Krokus (*Crocus* L.),
blüht im Frühling



Herbstzeitlose (*Colchicum autumnale*),
blüht im Herbst

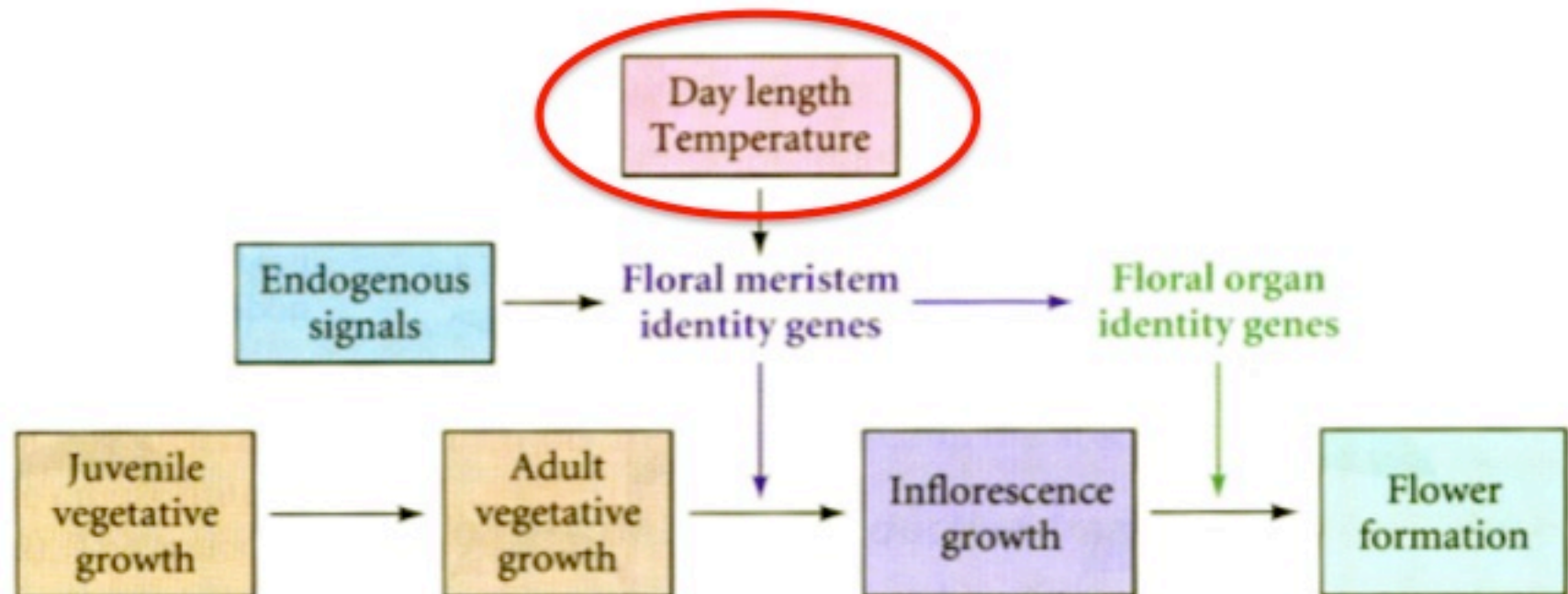
Interne and externe Signalgeber kontrollieren den Blühzeitpunkt

ermitteln des richtigen Blühzeitpunkt ist wichtig für den reproduktiven Erfolg



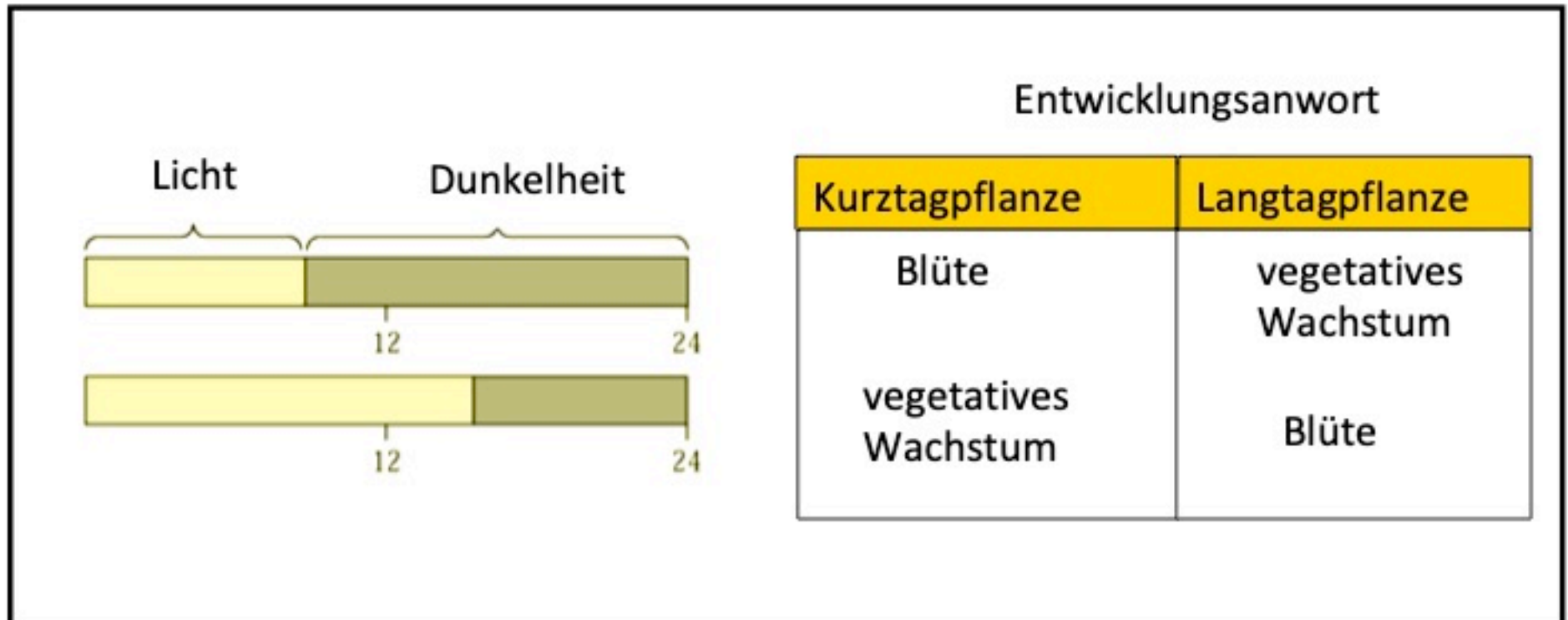
Aus einem vegetativen Meristem wird ein Blütenmeristem

viele Signale bestimmen den Blühzeitpunkt



externe Faktoren: vor allem Tageslänge und Temperatur

Licht: Blühinduktion bei Lang- und Kurztagepflanzen



Die Tageslänge wird durch die „innere Uhr“
und die Zeitgeber ermittelt.

Beispiele für Lang- und Kurztagpflanzen

Kurztagpflanzen

Amaranthus caudatus

Chrysanthemum hort.

Coffea arabica

Glycine max

Kalanchoe blossfeldiana

Perilla ocymoides

Setaria viridis

Xanthium strumarium

...



Langtagpflanzen

Arabidopsis thaliana

Avena sativa

Begonia semperflorens

Beta vulgaris

Hordeum vulgare

Hyoscyamus niger

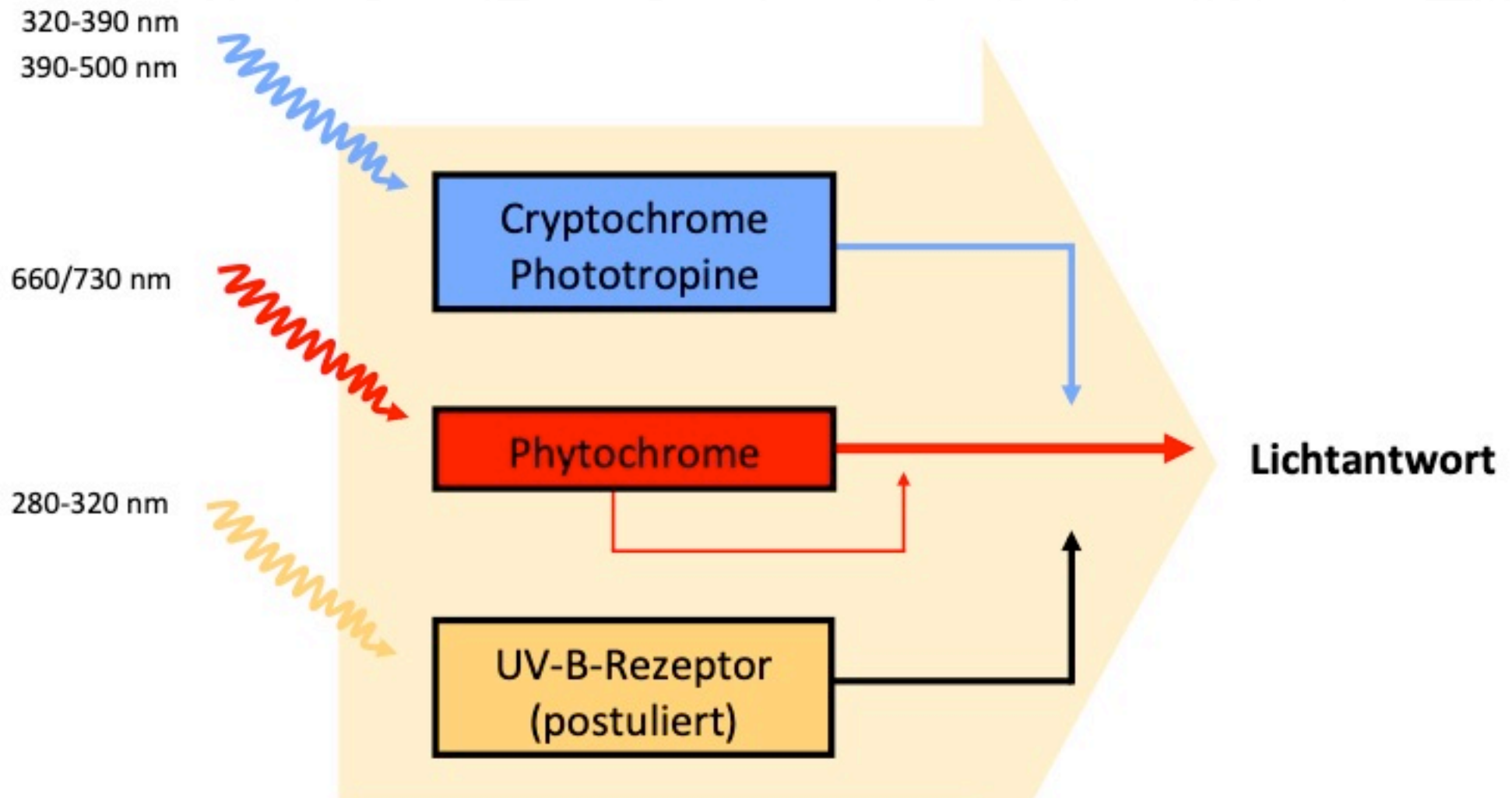
Lactuca sativa

Vicia faba

...

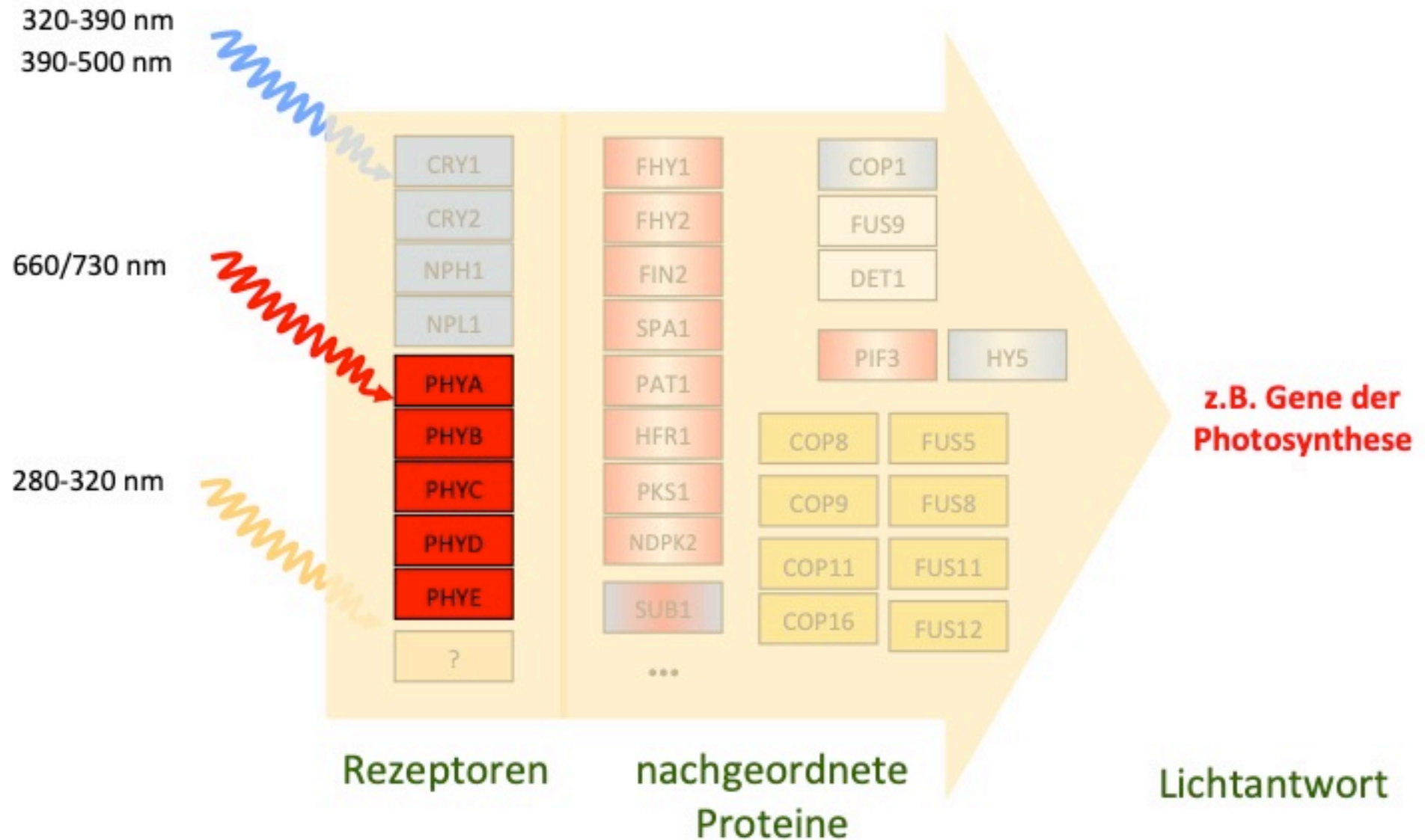


Lichtwahrnehmung bei Pflanzen

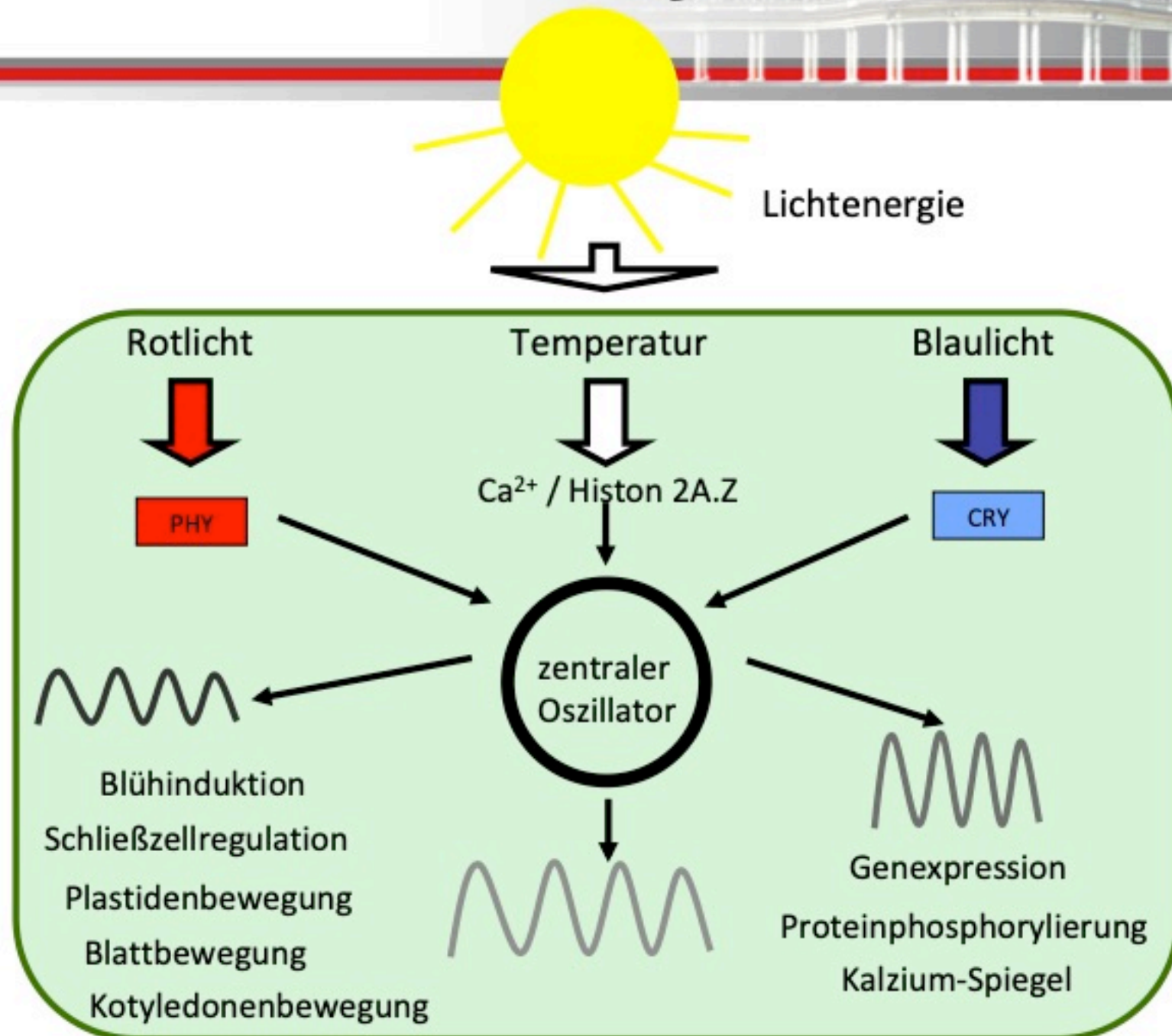


Pflanzen haben Rezeptoren für unterschiedliche Wellenlängen

Lichtwahrnehmung bei Pflanzen

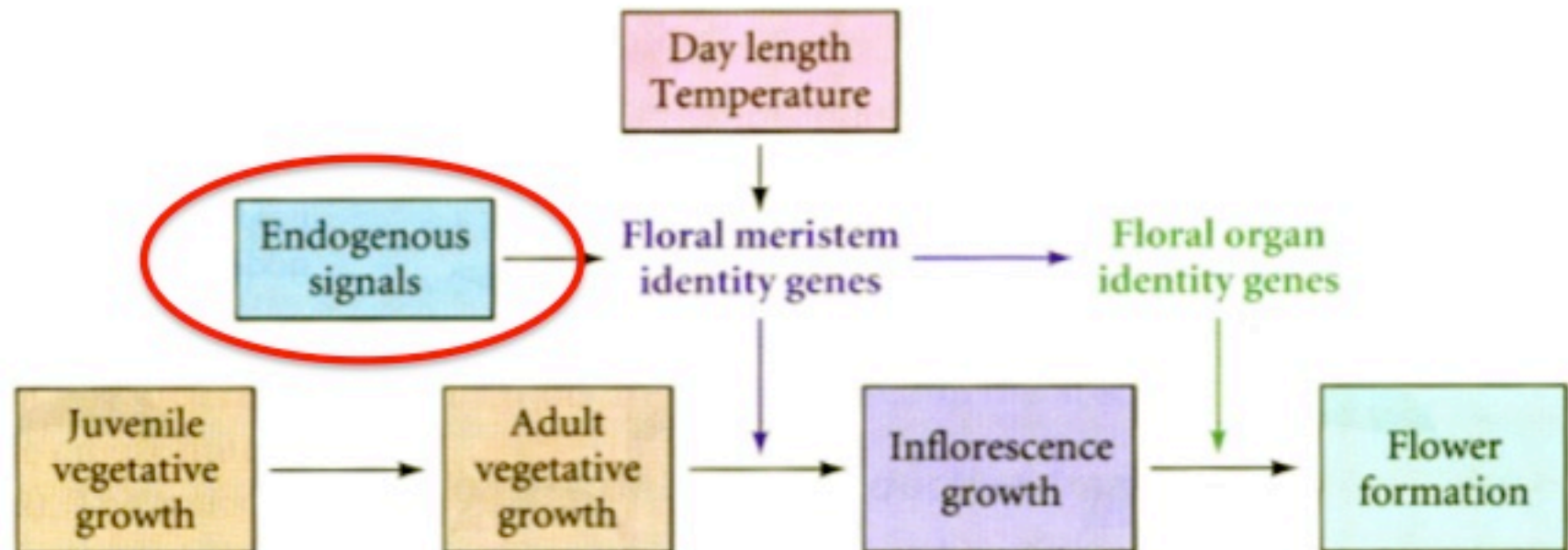


Circadiane Rhythmik



Aus einem vegetativen Meristem wird ein Blütenmeristem

viele Signale bestimmen den Blühzeitpunkt

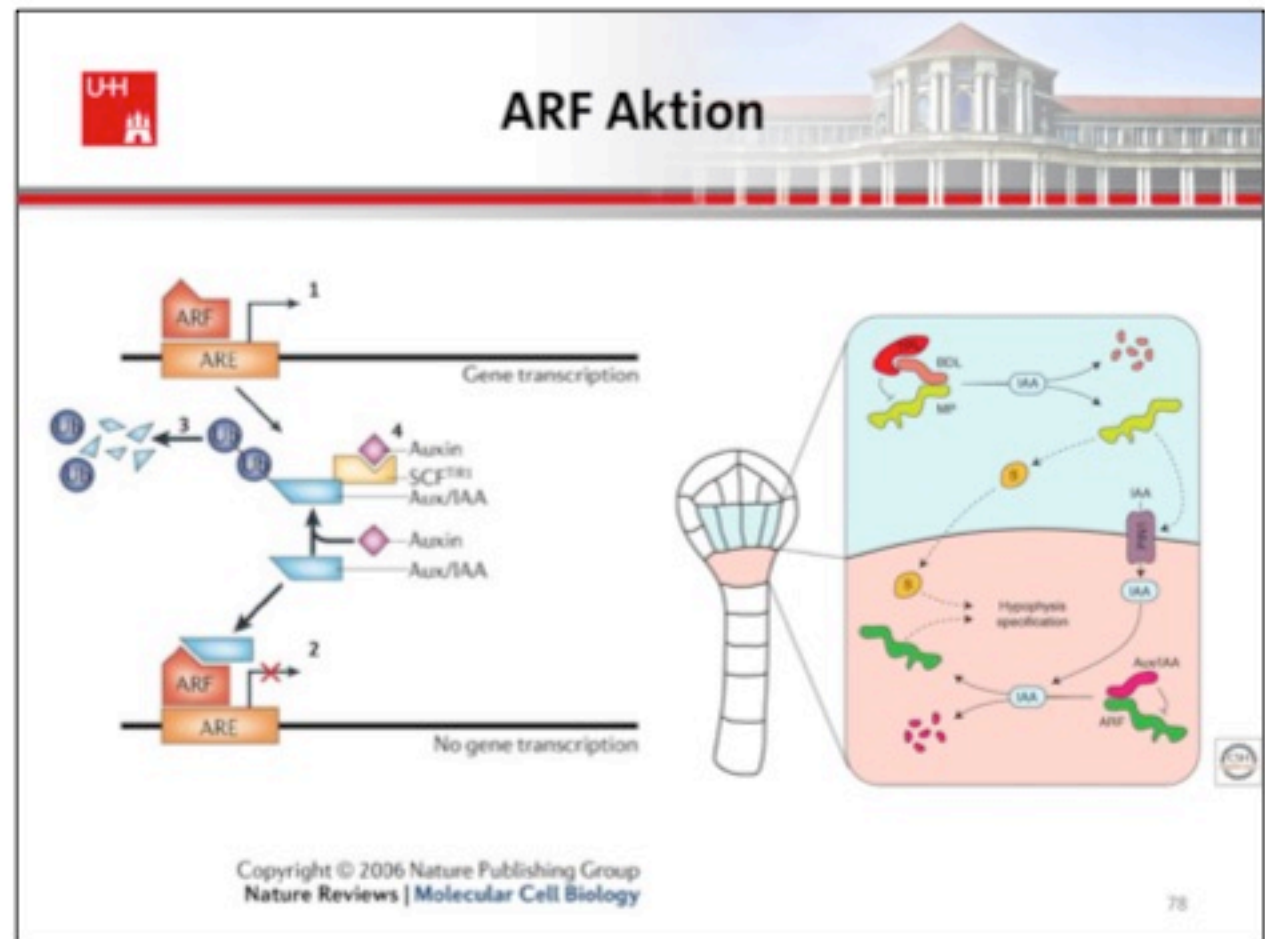


externe Faktoren: vor allem Tageslänge und Temperatur

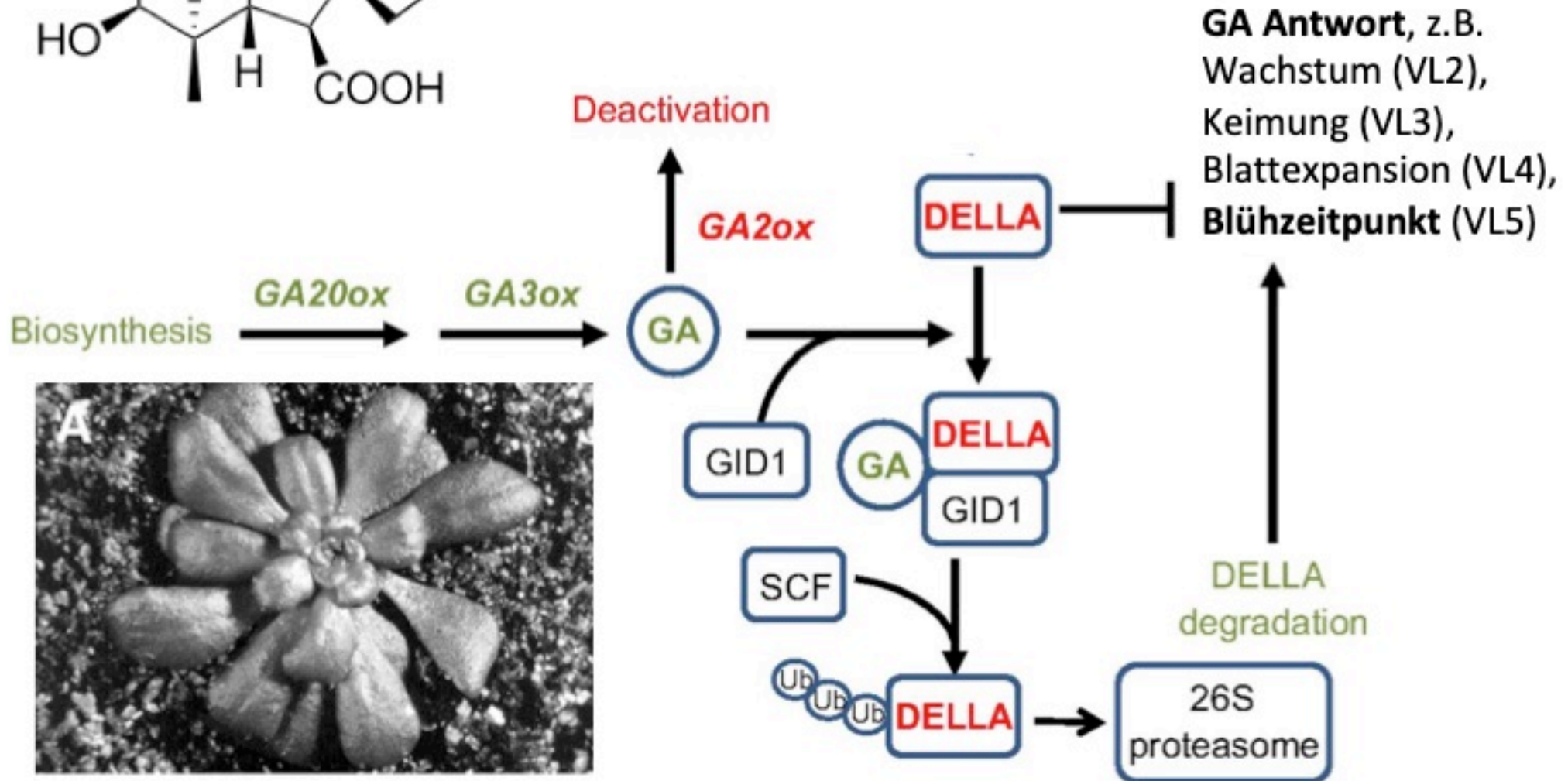
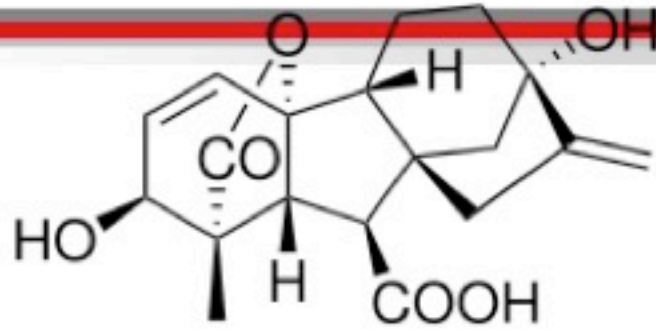
endogene Signale: z.B. Entwicklungsalter, Pflanzenhormone, vor allem Gibberellinsäure (GA) etc.

Vorlesung 2: Auxin Signaltransduktion

Das Pflanzenhormon Auxin vermittelt den **Abbau eines Repressors** (IAA), so dass ein Transkriptionsfaktor (ARF) aktiv werden kann.



Gibberellinsäure (GA)-Signaltransduktion



2 Monate alte *ga1* (Enzym im GA-Biosyntheseweg) Mutante

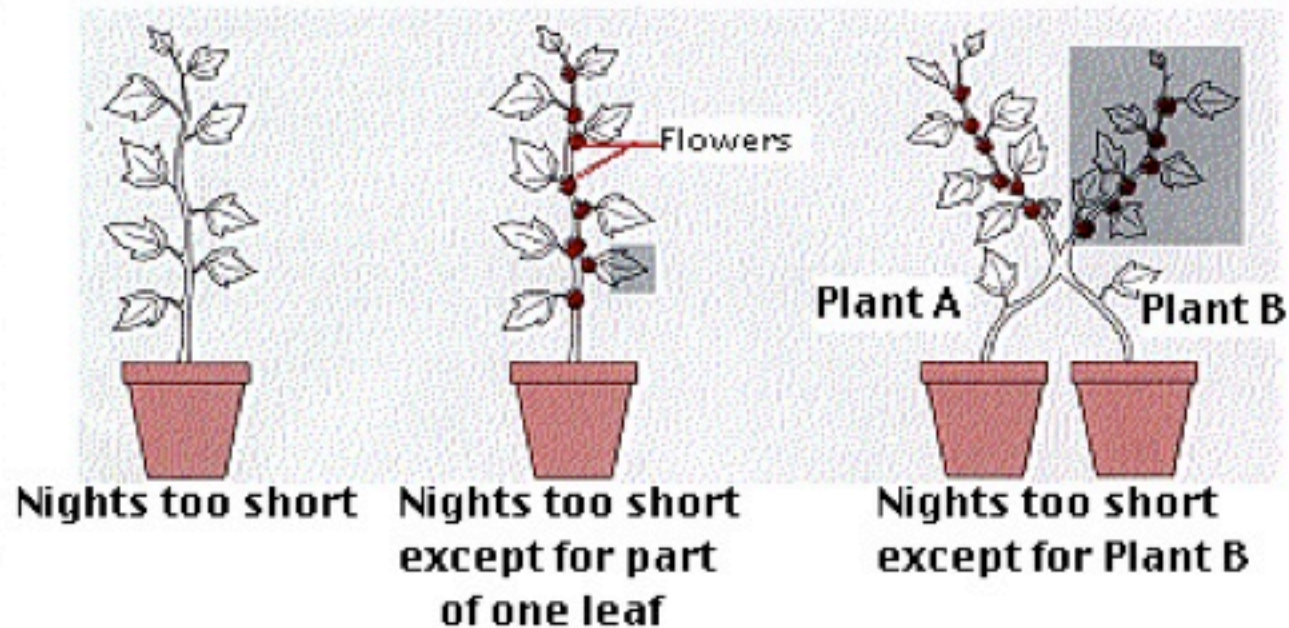
Florigen – eine 140 jährige Suche nach dem 'Blühhormon'



Julius Sachs

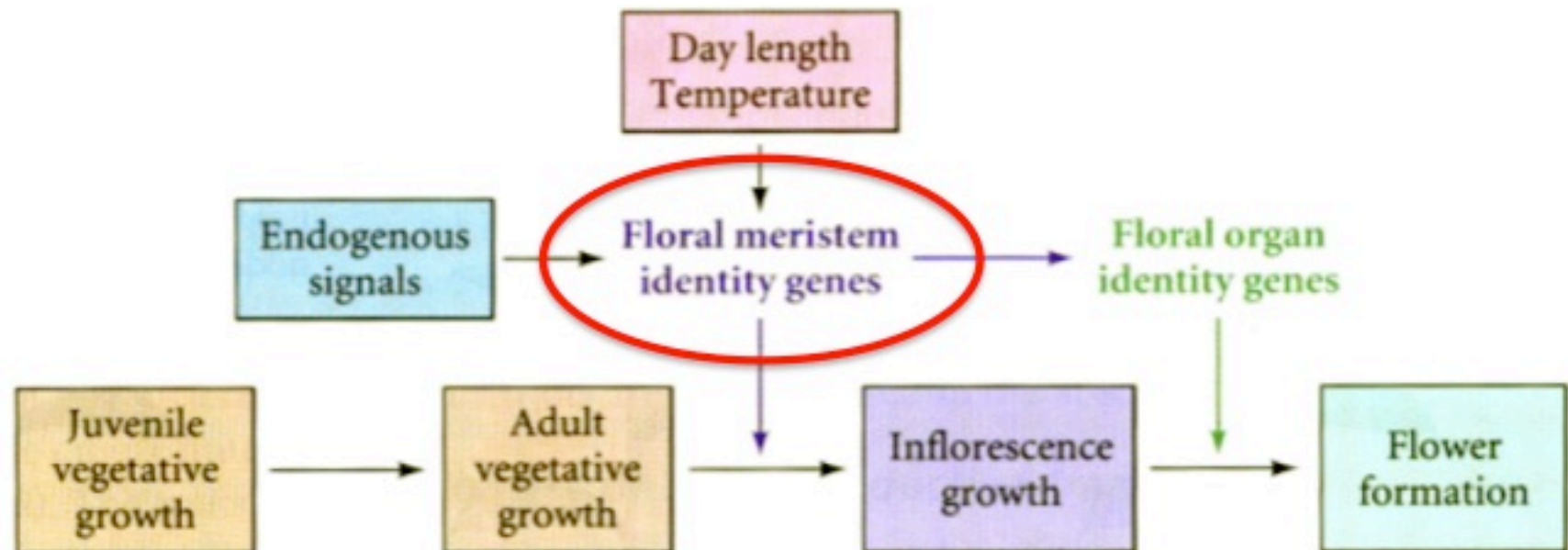
(* 2.10.1832 in Breslau; † 29.5. 1897 in Würzburg), deutscher Botaniker und Begründer der experimentellen Pflanzenphysiologie

Pfropfungsexperimente



Aus einem vegetativen Meristem wird ein Blütenmeristem

viele Signale bestimmen den Blühzeitpunkt



externe Faktoren: vor allem Tageslänge und Temperatur

endogene Signale: z.B. Entwicklungsalter, Pflanzenhormone, vor allem GA etc.

Die Suche nach dem Gral ...



Mutanten, die den Blühzeitpunkt nach hinten verschieben

Überexpression/Ektopische Expression soll Blühzeitpunkt nach vorne verschieben

mRNA/Protein soll mobil sein.

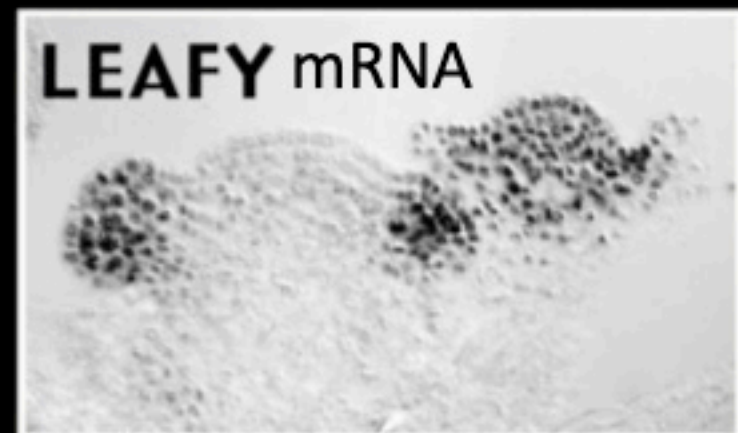
LEAFY kontrolliert die Blütenmeristemidentität



leafy Mutante



leafy Mutante

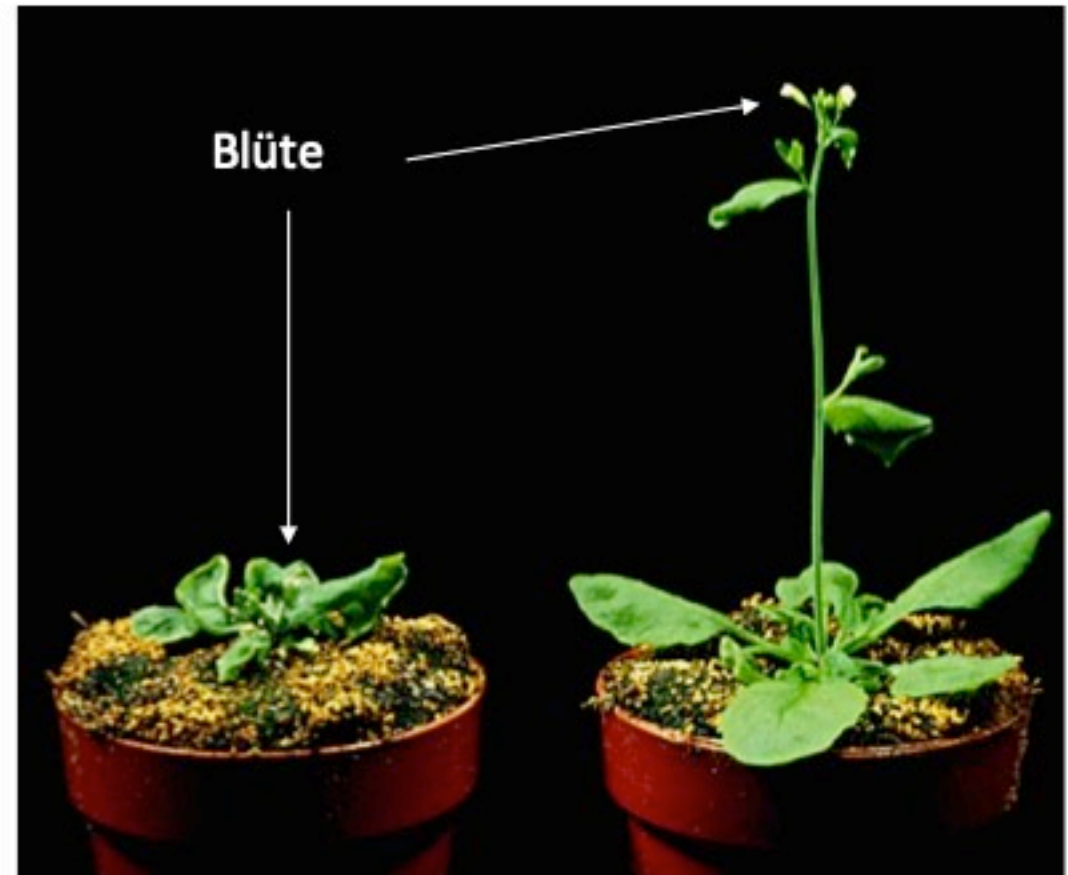


LFY ist NOTWENDIG und HINREICHEND für die Blüteninduktion



lfy Mutante

Funktionsverlust
→ **keine Blüte**



35S:LFY

WT

Überexpression in allen Geweben
→ **sofortige Blüte**

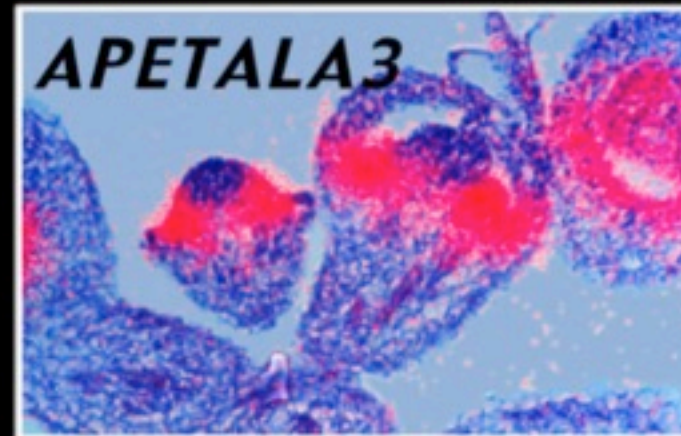
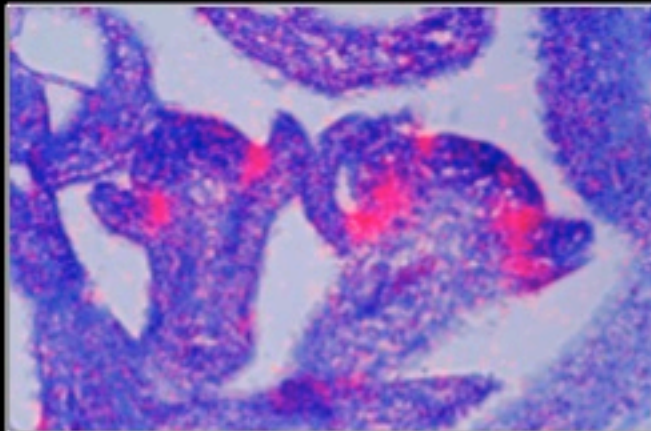
LEAFY kontrolliert die Blütenmeristemidentität



leafy



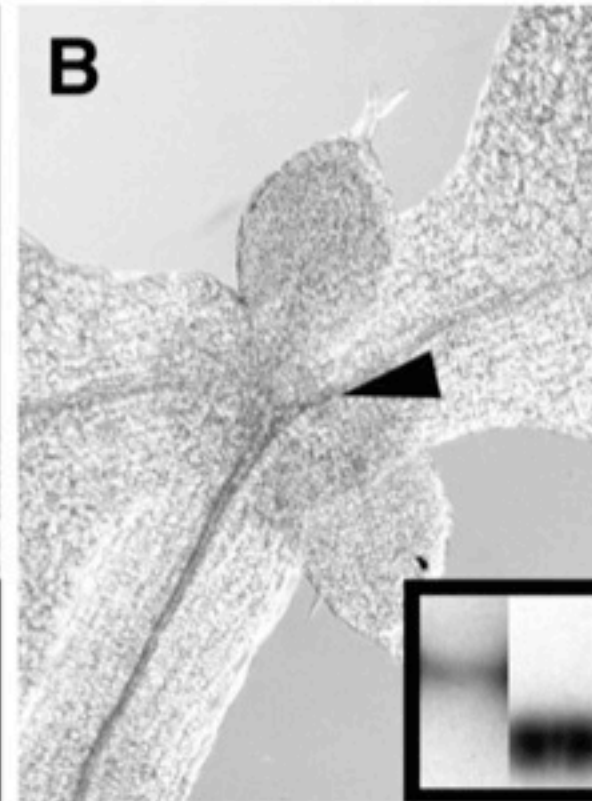
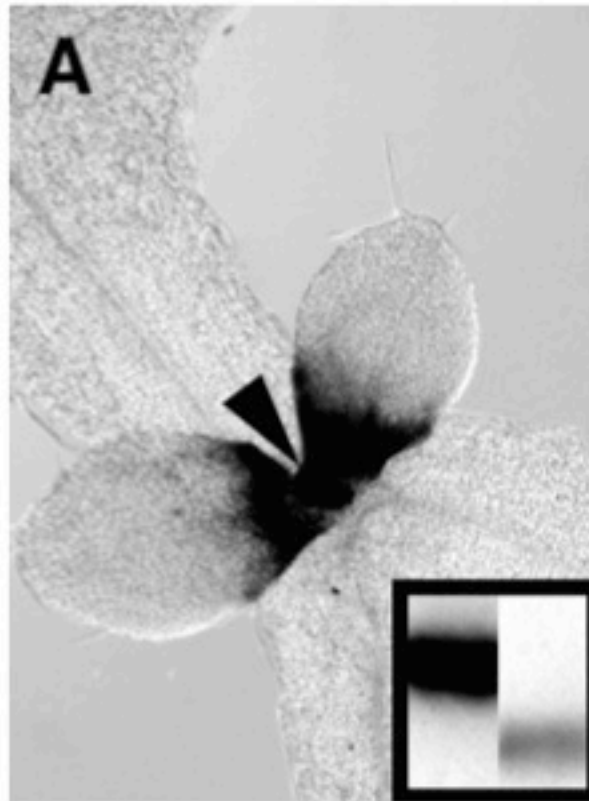
wildtype



GA aktiviert (unter anderem) LEAFY

Reporterkonstrukt: *PRO_{LFY}:GUS*

10 Tage alte
Wildtyp-Pflanze



10 Tage alte *ga1*
(Enzym im GA-
Biosyntheseweg)
Mutante

Inset zeigt die Ergebnisse einer qRT PCR mit LFY (links) und eIF4A (Kontrolle, rechts) von den Sprossen von 4 Wochen alten Pflanzen

Überexpression von LEAFY kann GA-Biosynthesemutanten retten

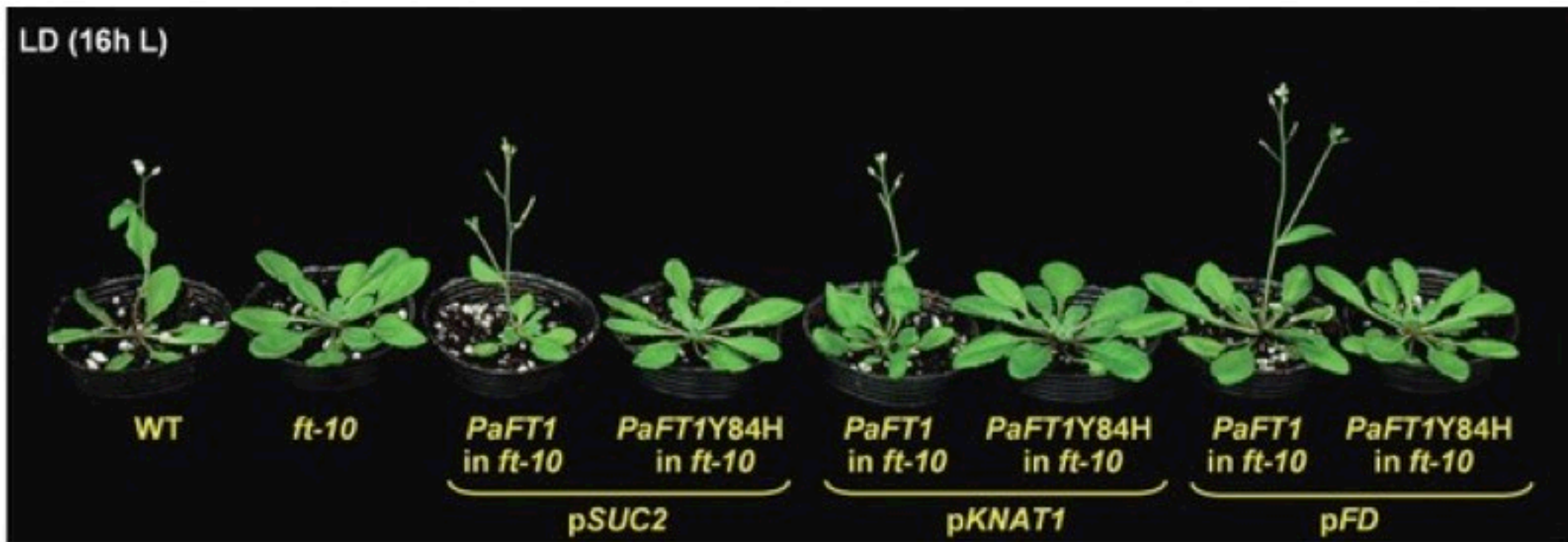


2 Monate alte ***ga1*** (Enzym im GA-Biosyntheseweg) Mutante



2 Monate alte ***ga1*** (Enzym im GA-Biosyntheseweg) Mutante, die ***PRO_{35S}::LFY*** exprimiert.

FLOWERING LOCUS T

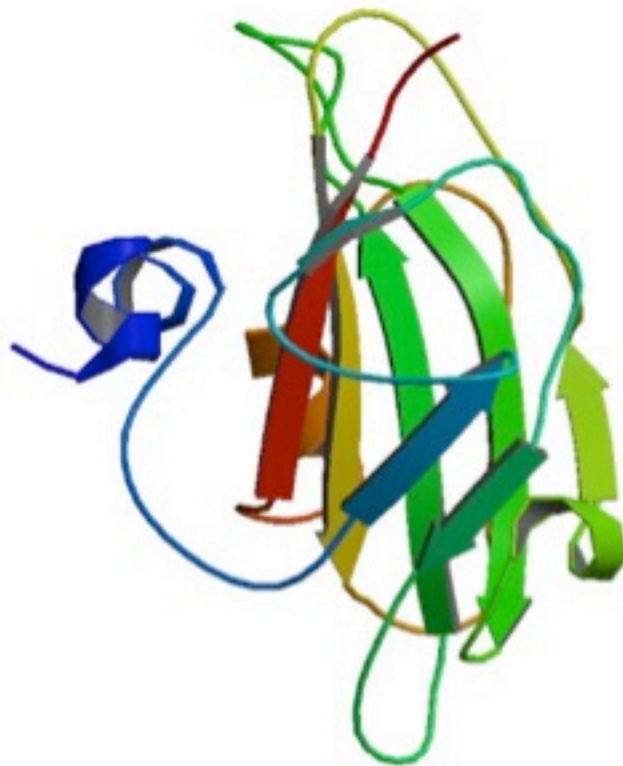


FT ist Florigen

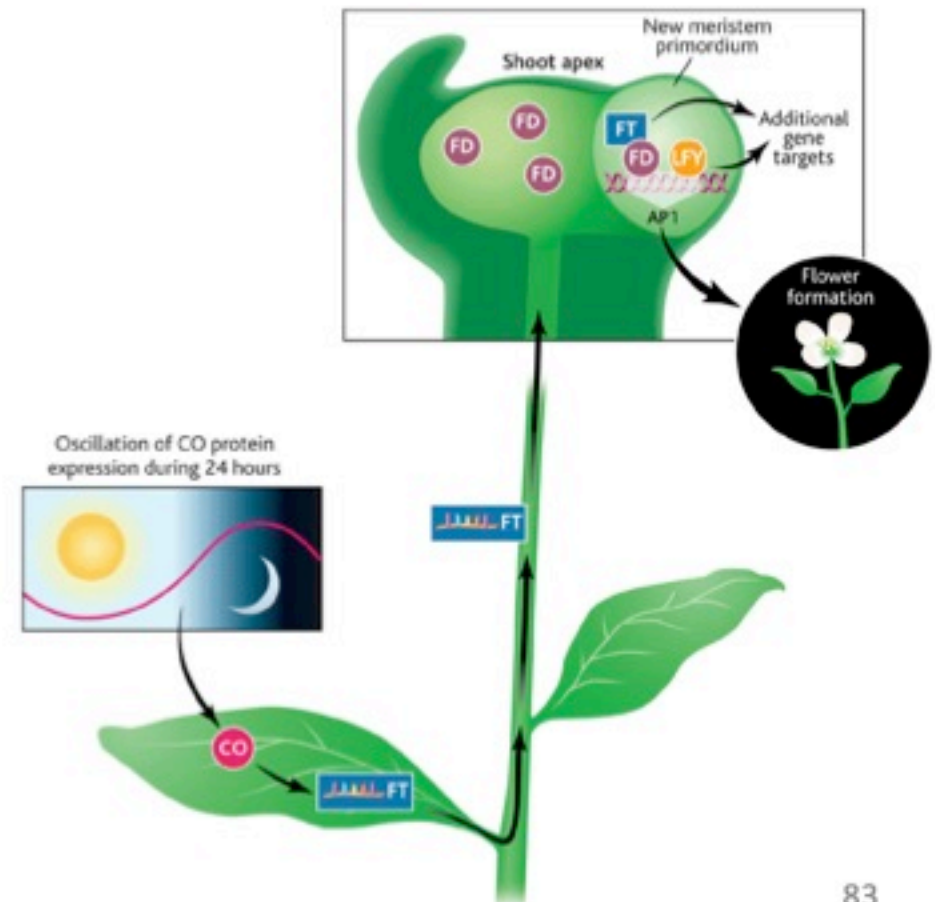
Corbesier et al. (2007) "FT Protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis" Science, 316 (5827): 1030-1033.

Abe, M. et al. (2005) "FD, a bZIP Protein Mediating Signals from the Floral Pathway Integrator FT at the Shoot Apex" Science, 309 (5737): 1052-1056.

Wigge, P.A., et al. (2005) "Integration of Spatial and Temporal Information During Floral Induction in Arabidopsis" Science 309 (5737): 1056-1059.

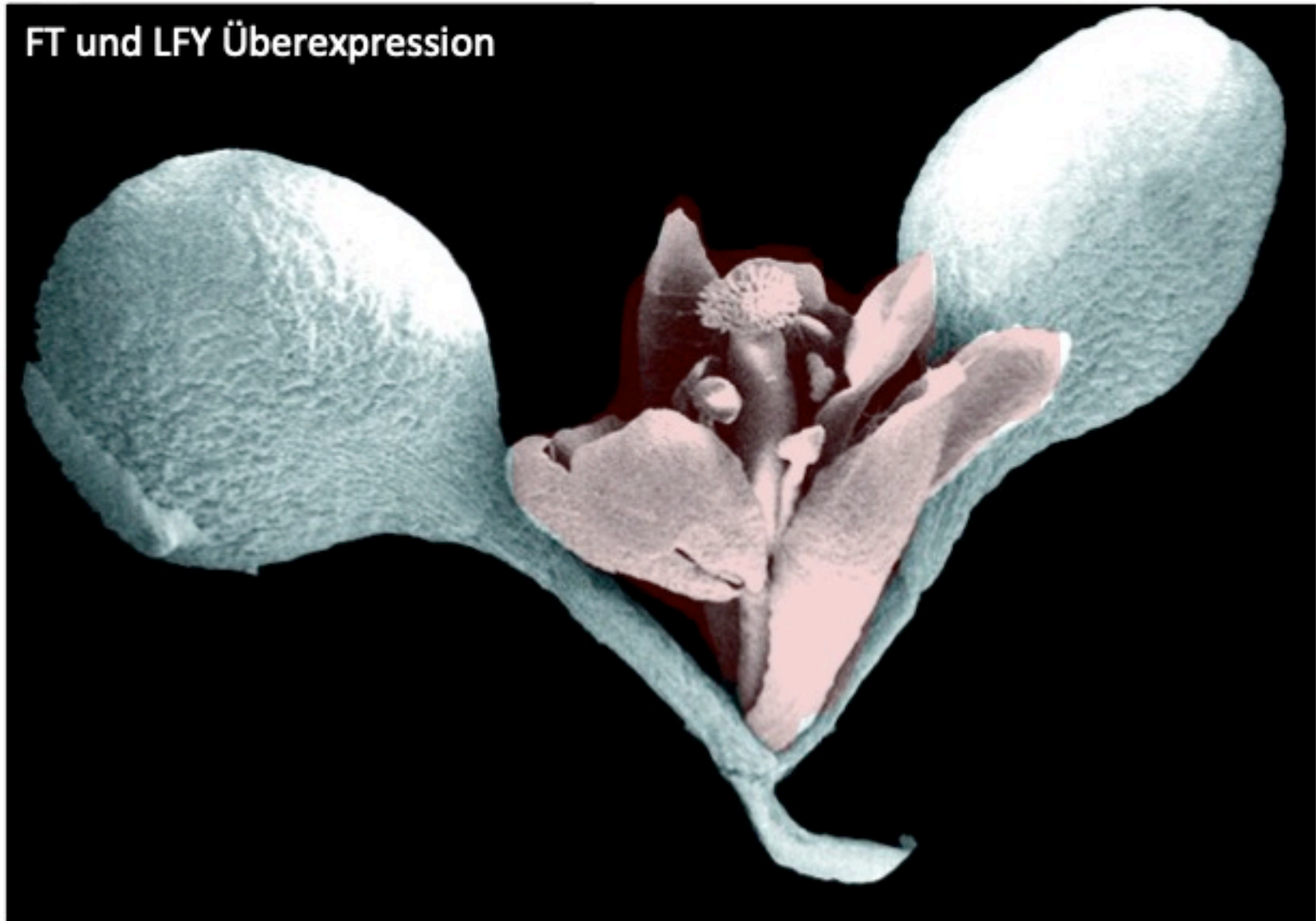


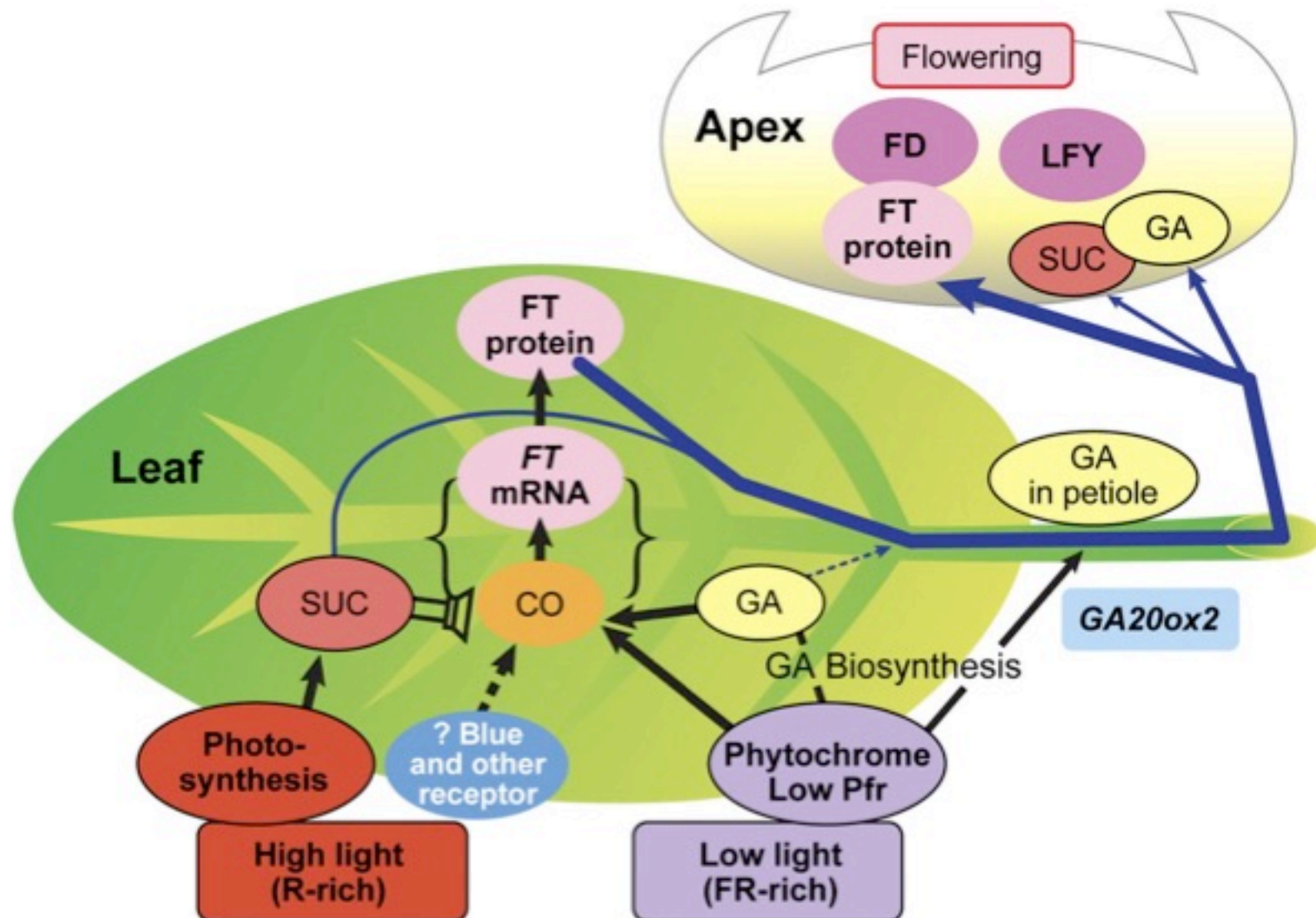
FT Struktur ähnelt der des *Raf* kinase inhibitor Proteins.



Gemeinsame Überexpression von zwei Blütenmeristem-Identitätsgenen

FT und LFY Überexpression







Ende Teil V